临床微生物学手册

Manual of Clinical Microbiology (12th Edition)

第12版

第一卷

● 原著者：Karen C. Carroll ［美］
Michael A. Pfaller ［美］
● 主　译：王　辉　马筱玲　钱　渊
李若瑜　曹建平

中華醫學電子音像出版社
CHINESE MEDICAL MULTIMEDIA PRESS

责任编辑：赵文羽
封面设计：金舵手世纪

AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

ISBN 978-7-83005-330-7

定价：600.00 元

临床微生物学手册

第12版

Manual of Clinical Microbiology (12th Edition)

● 原著者：Karen C. Carroll［美］

Michael A. Pfaller［美］

●主　译：王　辉　马筱玲　钱　渊

李若瑜　曹建平

第一卷

中華醫學電子音像出版社

CHINESE MEDICAL MULTIMEDIA PRESS

北　京

图书在版编目（CIP）数据

临床微生物学手册：第 12 版. 第一卷/（美）凯伦 · C. 卡罗尔（Karen C. Carroll）主编；
王辉等译. 一北京：中华医学电子音像出版社，2021. 3
ISBN 978-7-83005-330-7

Ⅰ. ①临… Ⅱ. ①凯… ②王… Ⅲ. ①微生物学一医学检验一手册
Ⅳ. ①R446. 5-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2020）第 252067 号

北京市版权局著作权合同登记章图字：01-2020-7021 号

临床微生物学手册(第 12 版)·第一卷
LINCHUANG WEISHENGWUXUE SHOUCE (DI 12 BAN) Ⅰ

主　　译：王　辉　马筱玲　钱　渊　李若瑜　曹建平
策划编辑：裴　燕　赵文羽
责任编辑：赵文羽
文字编辑：宫宇婷　周寇扣　孙葵葵　崔晓鸥　武　昱
校　　对：龚利霞
责任印刷：李振坤
出版发行：中华医学电子音像出版社
通信地址：北京市西城区东河沿街 69 号中华医学会 610 室
邮　　编：100052
E - mail：cma-cmc@cma. org. cn
购书热线：010-51322677
经　　销：新华书店
印　　刷：北京顶佳世纪印刷有限公司
开　　本：889mm×1194mm　1/16
印　　张：93. 75
字　　数：2664 千字
版　　次：2021 年 3 月第 1 版　2021 年 3 月第 1 次印刷
定　　价：600. 00 元

译者名单

主　　审　陈民钧　汤一苇　倪语星

主　　译　王　辉　马筱玲　钱　渊　李若瑜　曹建平

副 主 译　俞云松　曹　彬　胡必杰　孙自镛　苏建荣　刘文恩

　　　　　陈家旭　陆　玲　宁永忠

译　　者　（按姓氏拼音排序）

白志宇　天津市海河医院
曹　彬　中日友好医院
曹建平　中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所
曹敬荣　首都医科大学宣武医院
陈　茶　广州中医药大学第二附属医院，广东省中医院
陈宏斌　北京大学人民医院
陈家旭　中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所
陈民钧　中国医学科学院北京协和医院
陈中举　华中科技大学同济医学院附属同济医院
褚云卓　中国医科大学附属第一医院
崔仑标　江苏省疾病预防控制中心
戴二黑　石家庄市第五医院
戴媛媛　中国科学技术大学附属第一医院
杜　鸿　苏州大学附属第二医院
杜　艳　昆明医科大学第一附属医院
福　泉　内蒙古医科大学附属医院
付英梅　哈尔滨医科大学
耿　燕　西安交通大学第二附属医院
公衍文　山东大学第二医院
顾　兵　徐州医科大学附属医院
郭大文　哈尔滨医科大学附属第一医院
韩立中　上海交通大学医学院附属瑞金医院
韩晓旭　中国医科大学附属第一医院
侯铁英　广东省人民医院
胡必杰　复旦大学附属中山医院
胡付品　复旦大学附属华山医院
胡继红　国家卫生健康委临床检验中心
胡　媛　中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所
胡云建　北京医院
胡志东　天津医科大学总医院

黄　磊　北京大学第一医院
季　萍　新疆医科大学第一附属医院
贾　伟　宁夏医科大学总医院
金大智　杭州医学院
李荷楠　北京大学人民医院
李　敏　上海交通大学医学院附属仁济医院
李佩珊　南方医科大学第五附属医院
李若瑜　北京大学第一医院
李向阳　温州医科大学附属第二医院
李　轶　河南省人民医院检验科
梁宏洁　广西医科大学第一附属医院
廖　康　中山大学附属第一医院
刘根焰　南京医科大学第一附属医院
刘家云　空军军医大学第一附属医院
刘文恩　中南大学湘雅医院
刘　瑛　上海交通大学医学院附属新华医院
刘颖梅　中日友好医院
刘泽世　西安交通大学第二附属医院
鲁炳怀　中日友好医院
陆　玲　南京师范大学
罗燕萍　中国人民解放军总医院第一医学中心
吕火烊　浙江省人民医院
马筱玲　中国科学技术大学附属第一医院
马　莹　四川大学华西医院
穆　红　天津市第一中心医院
倪语星　上海交通大学医学院附属瑞金医院
宁永忠　清华大学附属垂杨柳医院
彭　静　华中科技大学同济医学院附属同济医院
钱　渊　首都儿科研究所
屈平华　广州中医药大学第二附属医院，广东省中医院
曲久鑫　深圳市第三人民医院
单　斌　昆明医科大学第一附属医院
沈　鸿　首都医科大学附属北京朝阳医院
芮勇宇　南方医科大学南方医院
苏丹虹　广州医科大学附属第一医院
苏建荣　首都医科大学附属北京友谊医院
孙恩华　山东大学齐鲁医院
孙宏莉　中国医学科学院北京协和医院
孙立颖　北京大学第一医院

孙自镛　华中科技大学同济医学院附属同济医院
汤一苇　美国丹纳赫集团中国诊断平台
陶传敏　四川大学华西医院
田瑞卿　保定市第一医院
王大燕　中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所
王红梅　郑州大学第一附属医院
王　辉　北京大学人民医院
王利君　北京清华长庚医院
王　倩　中国医科大学附属第一医院
王一民　中日友好医院
隗　明　首都医科大学附属北京朝阳医院
魏莲花　甘肃省人民医院
吴文娟　同济大学附属东方医院
伍　勇　中南大学湘雅三医院
徐春晖　中国医学科学院血液病医院(中国医学科学院血液学研究所)
徐和平　厦门大学附属第一医院
徐修礼　空军军医大学第一附属医院
徐元宏　安徽医科大学附属第一医院
许建成　吉林大学白求恩第一医院
杨　滨　福建医科大学附属第一医院
杨　青　浙江大学医学院附属第一医院
杨天赐　厦门大学附属中山医院
杨晓莉　中国人民解放军总医院第三医学中心
杨志宁　山西省心血管病医院
姚开虎　首都医科大学附属北京儿童医院，北京市儿科研究所
余方友　同济大学附属上海市肺科医院
俞云松　浙江大学医学院附属邵逸夫医院
喻　华　四川省医学科学院·四川省人民医院
曾　吉　华中科技大学同济医学院附属普爱医院
张红梅　石河子大学医学院第一附属医院
张利军　重庆医科大学附属第二医院
张　嵘　浙江大学医学院附属第二医院
张晓龙　中国检验检疫科学研究院
张蕴莉　锦州医科大学附属第一医院
赵建宏　河北医科大学第二医院
赵宗珉　中国医科大学附属第一医院
周宏伟　南方医科大学珠江医院
朱　镭　山西省儿童医院山西省妇幼保健院
邹明祥　中南大学湘雅医院

原著编辑委员会

Mary E. Brandt Sections VI and VII
Office of Laboratory Science and Safety, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

Carey-Ann D. Burnham Section II
Department of Pathology & Immunology, Division of Laboratory and Genomic Medicine, Washington University in St. Louis School of Medicine, St. Louis, Missouri

Angela Caliendo Sections IV and V
Alpert Medical School of Brown University, Providence, Rhode Island

J. Stephen Dumler Section II
Joint Departments of Pathology, Uniformed Services University of the Health Sciences, Walter Reed National Military Medical Center, Joint Pathology Center, Bethesda, Maryland

Christine C. Ginocchio Sections IV and V
Medical Affairs, bioMérieux/BioFire Diagnostics, Durham, North Carolina

Randall T. Hayden Sections IV and V
Department of Pathology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee

Elizabeth M. Johnson Sections VI and VII
Mycology Reference Laboratory, Public Health England National Infection Service, Bristol, United Kingdom

James Karlowsky Section I
Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

Melissa B. Miller Section II
Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina

Elisabeth Nagy Section II
Institute of Clinical Microbiology, University of Szeged, Szeged, Hungary

Jean Patel Section III
The Division of Healthcare Quality Promotion, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

Johann Pitout Section II
Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Calgary, and Division of Microbiology, Calgary Laboratory Services, Calgary, Alberta, Canada

Bobbi S. Pritt Section VIII
Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota

Gary W. Procop Sections VIII and IX
Department of Laboratory Medicine, Pathology and Laboratory Medicine Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio

Yi-Wei Tang Sections IV and V
Department of Laboratory Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, and Department of Pathology and Laboratory Medicine, Weill Medical College of Cornell University, New York, New York

原著撰稿者

APRIL N. ABBOTT
Department of Laboratory Medicine, Deaconess Health System, Evansville, Indiana

STEPHAN W. ABERLE
Center for Virology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

SINA M. ADL
University of Saskatchewan, Soil Sciences, College of Agriculture, Saskatoon, Saskatchewan, Canada

MARIA E. AGUERO-ROSENFELD
New York University Langone Health, Pathology, New York, New York

SARAH ABDALLAH AHMED
Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands

ALEXANDRE ALANIO
Unité Mycologie Moléculaire, CNRS UMR2000, Centre National de Référence des Mycoses Invasives et Antifongiques, Institut Pasteur, 75724 Paris cedex 15, France

KEVIN ALBY
Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania

DAVID C. ALEXANDER
Cadham Provincial Laboratory and Department of Medical Microbiology & Infectious Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

IBNE M. KARIM ALI
National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

GEORGE F. ARAJ
Department of Pathology and Laboratory Medicine, American University of Beirut Medical Center, Beirut, Lebanon

MATTHEW J. ARDUINO
Division of Healthcare Quality Promotion, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

H. RUTH ASHBEE
School of Molecular and Cellular Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds, United Kingdom

RONALD M. ATLAS
Department of Biology, University of Louisville, Louisville, Kentucky (Retired)

ROBERT L. ATMAR
Departments of Medicine and Molecular Virology & Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas

N. ESTHER BABADY
Department of Laboratory Medicine, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, New York

FAUSTO BALDANTI
Department of Clinical, Surgical, Diagnostics and Pediatric Sciences, University of Pavia, and Molecular Virology Unit, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italy

MATTHEW J. BANKOWSKI
Baptist Medical Center Jacksonville, Infectious Diagnostics Laboratory, Jacksonville, Florida

FRÉDÉRIC BARBUT
National Reference Laboratory for Clostridium difficile, Hôpital Saint-Antoine, and EA4065, Université Paris Descartes, Paris, France

JENNIFER DIEN BARD
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Children's Hospital Los Angeles, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, California

CÉCILE BÉBÉAR
USC EA 3671, University of Bordeaux, Department of Bacteriology, French National Reference Center for bacterial STI, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France

KARSTEN BECKER
University Hospital Münster, Institute of Medical Microbiology, Münster, Germany

ELIZABETH L. BERKOW
Centers for Disease Control and Prevention, Mycotic Diseases Branch, Atlanta, Georgia

KATHRYN A. BERNARD
National Microbiology Laboratory-CSCHAH, Public Health Agency of Canada, and Department of Medical Microbiology, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

BEVERLEY-ANN BIGGS
Victorian Infectious Diseases Service, Royal Melbourne Hospital, Parkville, Victoria, and Department of Medicine at the Peter Doherty Institute for Infection and Immunity, University of Melbourne, Melbourne, Australia

THOMAS BJARNSHOLT
Department of Clinical Microbiology, Rigshospitalet, and Department of Immunology and Microbiology, Costerton Biofilm Center, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

LUCAS S. BLANTON
Department of Internal Medicine – Infectious Diseases, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas

CHANTAL BLEEKER-ROVERS
Radboud University Medical Center, Department of Internal Medicine, and Radboud Expertise Center for Q Fever, Nijmegen, The Netherlands

CHRISTIAN BOGDAN
Mikrobiologisches Institut - Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg und Universitätsklinikum Erlangen, Erlangen, Germany

GUY BOIVIN
Department of Microbiology and Infectious Diseases, Laval University, Quebec City, QC, Canada

ANDREW M. BORMAN
United Kingdom National Mycology Reference Laboratory, Public Health England, Bristol, United Kingdom

YAN BOUCHER
University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

DONALD H. BOUYER
Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas

PATRICIA A. BRADFORD
Antimicrobial Development Specialists, LLC, Nyack, New York

CLAUDIA BRANDT
Institute for Medical Microbiology and Infection Control, University Hospital, Goethe University, Frankfurt, Germany

MARY E. BRANDT
Office of Laboratory Science and Safety, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

KEVIN E. BROWN
Virus Reference Department, Public Health England, London, United Kingdom

BARBARA A. BROWN-ELLIOTT
Department of Microbiology, The University of Texas Health Science Center at Tyler, Department of Microbiology, Tyler, Texas

DAVID A. BRUCKNER
Department of Pathology & Laboratory Medicine, David Geffen School of Medicine, University of California, Los Angeles, Los Angeles, California

BLAKE W. BUCHAN
Medical College of Wisconsin and Wisconsin Diagnostic Laboratories, Milwaukee, Wisconsin

RICHARD S. BULLER
Department of Pediatrics, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri

SUSAN M. BUTLER-WU
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Keck School of Medicine of USC, Los Angeles, California

ANGELA M. CALIENDO
Alpert Medical School of Brown University, Providence, Rhode Island

VITALIANO CAMA
Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

GERALD A. CAPRARO
Carolinas HealthCare System, Clinical Microbiology, Charlotte, North Carolina

DARCIE E. CARPENTER
IHMA, Inc., Schaumburg, Illinois

KAREN C. CARROLL
Division of Medical Microbiology, Department of Pathology, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland

MARIA DA GLÓRIA SIQUEIRA CARVALHO
Streptococcus Laboratory, Respiratory Diseases Branch, Division of Bacterial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

MARIANA CASTANHEIRA
JMI Laboratories, North Liberty, Iowa

ADAM J. CAULFIELD
Spectrum Health Regional Laboratory, Grand Rapids, Michigan

MAIKEN CAVLING-ARENDRUP
Department of Microbiology & Infection Control, Statens Serum Institut; Department of Clinical Microbiology, Rigshospitalet; and Department of Clinical Medicine, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

ANGELLA CHARNOT-KATSIKAS
Department of Pathology, University of Chicago, Chicago, Illinois

SHARON C.-A. CHEN
Westmead Hospital, Infectious Diseases, Westmead, NSW 2145, Australia

MAX CHERNESKY
Pediatrics, Pathology and Molecular Medicine, McMaster University/St Josephs Healthcare, Hamilton, Ontario, Canada

CHENG-FENG CHIANG
Viral Special Pathogens Branch, Division of High Consequence Pathogens and Pathology, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

SUNWEN CHOU
Department of Medicine, Oregon Health and Sciences University, Portland, Oregon

JENS JØRGEN CHRISTENSEN
Institute of Clinical Medicine, University of Copenhagen, and Department of Clinical Microbiology, Slagelse Hospital, Slagelse, Denmark

OANA CIOFU
Department of Immunology and Microbiology, Costerton Biofilm Center, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

JÉRÔME CLAIN
UMR 216 IRD MERIT, Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, 75006 Paris, France

BRYAN R. COBB
Roche Molecular Systems, Pleasanton, California

TOM COENYE
Laboratory of Pharmaceutical Microbiology, Ghent University, Ghent, Belgium

GEORG CONRADS
Division of Oral Microbiology and Immunology, RWTH Aachen University Hospital, Aachen, Germany

PATRICIA S. CONVILLE
Division of Microbiology Devices, Office of In-Vitro Diagnostics and Radiological Health, Center for Devices and Radiological Health, Food and Drug Administration, Silver Spring, Maryland

PIET COOLS
Laboratory Bacteriology Research, Department of Microbiology, Immunology and Clinical Chemistry, Faculty of Medicine and Health Sciences, Ghent University, Ghent, Belgium

JENNIFER R. COPE
National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

MARC ROGER COUTURIER
University of Utah/ARUP Laboratories, Pathology/Infectious Disease Microbiology, Salt Lake City, Utah

BART J. CURRIE
Menzies School of Health Research and Northern Territory Medical Program, Royal Darwin Hospital, Darwin, Northern Territory, Australia

KATE CUSCHIERI
Scottish HPV Reference Laboratory, Department of Laboratory Medicine, Royal Infirmary of Edinburgh, Edinburgh, Scotland

MELANIE T. CUSHION
Department of Internal Medicine, Division of Infectious Diseases, University of Cincinnati College of Medicine, and the Cincinnati VA Medical Center, Cincinnati, Ohio

STEVEN D. DALLAS
UT Health San Antonio, Department of Pathology and Laboratory Medicine, San Antonio, Texas

INGER K. DAMON
Centers for Disease Control and Prevention, Division of High Consequence Pathogens and Pathology, Atlanta, Georgia

G. SYBREN DE HOOG
Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, The Netherlands

JOHN DEKKER
National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

PETER DEPLAZES
Institute of Parasitology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

EDWARD P. DESMOND
Mycobacteriology Section, Microbial Diseases Laboratory, California Department of Public Health, Richmond, California

DANIEL J. DIEKEMA
Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine, and Division of Medical Microbiology, Department of Pathology, University of Iowa College of Medicine, Iowa City, Iowa

ELIZABETH A. DIETRICH
Bacterial Diseases Branch, Division of Vector-Borne Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colorado

CHRISTOPHER D. DOERN
Department of Pathology, Virginia Commonwealth University Medical Center, Richmond, Virginia

SHEILA C. DOLLARD
Division of Viral Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

FRANÇOISE DROMER
Institut Pasteur, Unité de Mycologie Moléculaire, Centre National de Référence des Mycoses Invasives et Antifongiques, CNRS UMR2000, Paris, France

J. STEPHEN DUMLER
Joint Departments of Pathology, Uniformed Services University of the Health Sciences, Walter Reed National Military Medical Center, Joint Pathology Center, Bethesda, Maryland

JAMES J. DUNN
Department of Pathology, Texas Children's Hospital, and Department of Pathology and Immunology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas

PAUL H. EDELSTEIN
University of Pennsylvania Perelman School of Medicine, Pathology and Laboratory Medicine, Philadelphia, Pennsylvania

JOHANNES ELIAS
Instiute of Microbiology, DRK Kliniken Berlin, Berlin, Germany

HERMES ESCALANTE
Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Peru

RICHARD R. FACKLAM
Streptococcus Laboratory, Respiratory Diseases Branch, Division of Bacterial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

FERRIC C. FANG
Departments of Laboratory Medicine and Microbiology, University of Washington School of Medicine, Seattle, Washington

JOHN J. FARMER III
United States Public Health Service (Retired), Stone Mountain, Georgia

MATTHEW L. FARON
Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin

MICHAEL S. FORMAN
Division of Medical Microbiology, Department of Pathology, The Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore, Maryland

STEPHEN J. FORSYTHE
foodmicrobe.com, Nottingham, United Kingdom

KAREN M. FRANK
Department of Laboratory Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

MATTHIAS FROSCH
Institute of Hygiene and Microbiology, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany

NAOMI J. GADSBY
Royal Infirmary of Edinburgh, Specialist Virology Centre, Dept. Laboratory Medicine, Edinburgh, Lothian EH16 4SA, United Kingdom

RENEE L. GALLOWAY
Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

BHANU P. GANESH
Department of Neurology, The University of Texas Health Science Center at Houston, Houston, Texas

HECTOR H. GARCIA
Universidad Peruana Cayetano Heredia, Center for Global Health, Lima, Peru

LYNNE S. GARCIA
LSG & Associates, Santa Monica, California

DEA GARCIA-HERMOSO
Unité Mycologie Moléculaire, CNRS UMR2000, Centre National de Référence des Mycoses Invasives et Antifongiques, Institut Pasteur, 75724 Paris cedex 15, France

BARBARA C. GÄRTNER
Institute for Microbiology and Hygiene, Saarland University, Faculty of Medicine and Medical Center, Homburg/Saar, Germany

WALTER GEIßDÖRFER
Mikrobiologisches Institut - Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg and Universitätsklinikum Erlangen, Erlangen, Germany

PETER GERNER-SMIDT
National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

CHRISTINE C. GINOCCHIO
Medical Affairs, bioMérieux/BioFire Diagnostics, Durham, North Carolina

WILLIAM A. GLOVER II
Washington State Public Health Laboratories, Shoreline, Washington

BEATRIZ L. GÓMEZ GIRALDO
School of Medicine and Health Sciences, Translational Microbiology and Emerging Diseases Group (MICROS), Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia

MARK D. GONZALEZ
Department of Pathology, Children's Healthcare of Atlanta, Atlanta, Georgia

ALEXANDER L. GRENINGER
Department of Laboratory Medicine, University of Washington, and Vaccine and Infectious Disease Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington

JOSEP GUARRO
Universitat Rovira i Virgili, Mycology Unit, Medical School and IISPV, Reus, Spain

CLIFFORD J. GUNTHEL
Infectious Disease Program, Grady Health System, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia

CATRIONA L. HALLIDAY
Westmead Hospital, Infectious Diseases, Westmead, NSW 2145, Australia

RANDALL T. HAYDEN
Department of Pathology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee

ALBERT HEIM
Hannover Medical School, Virology, Hannover, Germany

WALID HENEINE
Division of HIV/AIDS Prevention, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

CAROLE J. HICKMAN
Viral Vaccine Preventable Diseases Branch, Division of Viral Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

SARAH K. HIGHLANDER
Pathogen and Microbiome Division, Translational Genomics Research Institute, Flagstaff, Arizona

RICHARD L. HODINKA
Department of Biomedical Sciences, University of South Carolina School of Medicine Greenville and Greenville Health System, Greenville, South Carolina

NIELS HØIBY
Department of Clinical Microbiology, Rigshospitalet, and Department of Immunology and Microbiology, Costerton Biofilm Center, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

MARTIN HOLFELDER
Department of Microbiology, Limbach Laboratory, Heidelberg, Germany

AMY J. HORNEMAN
VA Maryland Health Care System, Pathology and Laboratory Service, Baltimore, Maryland

REBECCA T. HORVAT
Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Kansas School of Medicine, Kansas City, Kansas

DIANA D. HUANG
Department of Microbial Pathogens and Immunity, Rush University Medical Center, Chicago, Illinois

ROMNEY M. HUMPHRIES
Accelerate Diagnostics, Tucson, and Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Arizona, Tucson, Arizona

ELIZABETH A. HUNSPERGER
Diagnostics and Laboratory Systems Program, Centers for Disease Control and Prevention, Centers for Global Health, Division of Global Health Protection, Nairobi, Kenya

JOSEPH P. ICENOGLE
Viral Vaccine Preventable Diseases Branch, Division of Viral Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

JACQUES IZOPET
Department of Virology, National Reference Center for Hepatitis E virus, CHU Toulouse, and Center for Pathophysiology of Toulouse-Purpan, INSERM UMR1043 / CNRS UMR 5282, CPTP, Toulouse University Paul Sabatier, Toulouse, France

KEITH R. JEROME
Department of Laboratory Medicine, University of Washington, Vaccine and Infectious Disease Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington

JUAN A. JIMENEZ
Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Laboratorio de Parasitología en Fauna Silvestre y Zoonosis, Lima, Peru

CRYSTAL N. JOHNSON
APC Microbiome Institute and Teagasc Food Research Centre, Moorepark Biosciences Department, Fermoy, Co. Cork, Ireland

ELIZABETH M. JOHNSON
Mycology Reference Laboratory, Public Health England National Infection Service, Bristol, United Kingdom

MALCOLM K. JONES
School of Veterinary Sciences, The University of Queensland, Brisbane, Qld 4072, Australia

JAMES H. JORGENSEN
University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas

NASSIM KAMAR
Center for Pathophysiology of Toulouse-Purpan, INSERM UMR1043 / CNRS UMR 5282, CPTP, Toulouse University Paul Sabatier, and Department of Nephrology and Organ Transplantation, CHU Toulouse, Toulouse, France

PETER KÄMPFER
Institut für Angewandte Mikrobiologie, Universität Giessen, Giessen, Germany

JAMES A. KARLOWSKY
Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

JENNIFER KEISER
Department of Medical Parasitology and Infection Biology, Swiss Tropical and Public Health Institute, CH-4002 Basel, Switzerland

NANCY P. KELLER
University of Wisconsin-Madison, Medical Microbiology and Immunology and Bacteriology, Madison, Wisconsin

GILBERT J. KERSH
Centers for Disease Control and Prevention, Rickettsial Zoonoses Branch, Atlanta, Georgia

PAUL E. KILGORE
Eugene Applebaum College of Pharmacy and Health Sciences and Department of Family Medicine and Public Health Sciences, School of Medicine, Wayne State University, Detroit, Michigan

LUKE C. KINGRY
Bacterial Diseases Branch, Division of Vector-Borne Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colorado

JOHN D. KLENA
Viral Special Pathogens Branch, Division of High Consequence Pathogens and Pathology, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

LAURA M. KOETH
Laboratory Specialists, Inc., Westlake, Ohio

EIJA KÖNÖNEN
Institute of Dentistry, University of Turku, Turku, Finland

THOMAS G. KSIAZEK
Galveston National Laboratory, Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas

ED KUIJPER
Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Centre, 2333 ZA Leiden, The Netherlands

JAIME LABARCA
Departamento de Enfermedades Infecciosas, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Diagonal Paraguay 362, Santiago 8330077, Chile

PHILIPPE LAGACÉ-WIENS
Diagnostic Services, Shared Health, and Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, Max Rady College of Medicine, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

DARYL M. LAMSON
Division of Infectious Diseases, Wadsworth Center, New York State Department of Health, Albany, New York

BRIGITTE LAMY
CHU Nice, Université Côte d'Azur and INSERM U1065, Bactériologie, Nice, France

MARIE LOUISE LANDRY
Laboratory Medicine and Internal Medicine, Yale University, New Haven, Connecticut

PAUL A. LAWSON
Department of Microbiology and Plant Biology, University of Oklahoma, Norman, Oklahoma

JACQUES LE BRAS
UMR 216 IRD MERIT, Faculty of Pharmacy, Paris Descartes University, 75006 Paris, France

AMY L. LEBER
Nationwide Children's Hospital, Clinical Microbiology and Immunoserology, Department of Laboratory Medicine, Columbus, Ohio

NATHAN A. LEDEBOER
Department of Pathology, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin

KARIN LEDER
Infectious Disease Epidemiology Unit, School of Epidemiology and Preventive Medicine, Monash University, Victorian Infectious Disease Service, Royal Melbourne Hospital, Victoria, Australia

ELLIOT J. LEFKOWITZ
Department of Microbiology, The University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama

DIANE S. LELAND
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana

PAUL N. LEVETT
BC Centre for Disease Control Public Health Laboratory, Vancouver, British Columbia, Canada

JAMES S. LEWIS, II
Oregon Health and Science University, Departments of Pharmacy & Infectious Diseases, Portland, Oregon

SHOU-YEAN GRACE LIN
Mycobacteriology Section, Microbial Diseases Laboratory, California Department of Public Health, Richmond, California

DAVID S. LINDSAY
Virginia Tech, Biomedical Sciences and Pathobiology, Blacksburg, Virginia

MARK D. LINDSLEY
Mycotic Diseases Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

ANDREA J. LINSCOTT
Ochsner Medical Center, Department of Pathology and Laboratory Medicine, New Orleans, Louisiana

JOHN J. LiPUMA
Department of Pediatrics and Communicable Diseases, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan

SHAWN R. LOCKHART
Mycotic Diseases Branch, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

MICHAEL LOEFFELHOLZ
Department of Pathology and Clinical Microbiology Laboratory, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas

XIAOYAN LU
Division of Viral Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

NELL S. LURAIN
Department of Microbial Pathogens and Immunity, Rush University Medical Center, Chicago, Illinois

DUNCAN MacCANNELL
National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

HUGO MADRID
Universidad Mayor, Centro de Genómica y Bioinformática, Santiago, Chile

STEVEN D. MAHLEN
Affiliated Laboratory, Inc., Clinical Microbiology, Bangor, Maine

ISABELLA MARTIN
Pathology, Dartmouth-Hitchcock Medical Center, Lebanon, New Hampshire

ALEXANDER MATHIS
Institute of Parasitology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

BLAINE MATHISON
ARUP Laboratories, Infectious Disease Division, Salt Lake City, Utah

JAMES B. McAULEY
Rush University Medical Center, Chicago, Illinois

GERALD McDONNELL
DePuy Synthes Companies, Johnson & Johnson, Raritan, New Jersey

ERIN McELVANIA
Pathology, Evanston Hospital/NorthShore University HealthSystem, Evanston, Illinois

KARIN L. McGOWAN
University of Pennsylvania, Department of Pathology and Laboratory Medicine, Perelman School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania (Emeritus)

SARAH L. McGUINNESS
Infectious Disease Epidemiology Unit, School of Epidemiology and Preventive Medicine, Monash University, Department of Infectious Diseases, The Alfred Hospital, Victoria, Australia

DONALD P. McMANUS
QIMR Berghofer Medical Research Institute, Herston, Queensland 4006, Australia

LEONEL MENDOZA
Michigan State University, Microbiology and Molecular Genetics, East Lansing, Michigan

WIELAND MEYER
Westmead Millennium Institute for Medical Research, Infectious Diseases, Westmead, NSW 2145, Australia

LINDA A. FEDERICI MILLER
CMID Pharma Consulting, LLC, Dresher, Pennsylvania

RHODA ASHLEY MORROW
University of Washington and Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington

ANNETTE MOTER
Charité-Universitätsmedizin Berlin, Biofilmzentrum des Deutschen Herzzentrums Berlin, Berlin, Germany

IONA MUNJAL
Department of Pediatrics, Montefiore Medical Center and Albert Einstein College of Medicine, and Pfizer Vaccine Clinical Research & Development, Bronx, New York

IRVING NACHAMKIN
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania

ELISABETH NAGY
Institute of Clinical Microbiology, University of Szeged, Szeged, Hungary

RONALD C. NEAFIE
Retired, Former Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC

ALEXANDR NEMEC
Laboratory of Bacterial Genetics, Centre for Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health, Prague, Czech Republic

TERRY FEI FAN NG
National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

XIAOHUI CHEN NIELSEN
Department of Clinical Microbiology, Slagelse Hospital, Slagelse, Denmark

FREDERICK S. NOLTE
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Medical University of South Carolina, Charleston, South Carolina

CARMELLE T. NORICE-TRA
Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

NIELS NØRSKOV-LAURITSEN
Clinical Microbiology, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark

SUSAN NOVAK-WEEKLEY
Qvella, Carlsbad, California

THOMAS B. NUTMAN
Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland

KERRY O'DONNELL
Mycotoxin Prevention and Applied Microbiology Research Unit, National Center for Agricultural Utilization Research, ARS-USDA, Peoria, Illinois

VICTORIA A. OLSON
Poxvirus and Rabies Branch, Division of High Consequence Pathogens and Pathologies, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

LILLIAN A. ORCIARI
Poxvirus and Rabies Branch, Division of High Consequence Pathogens and Pathologies, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

OLIVIER ORTHOLARY
Unité Mycologie Moléculaire, CNRS UMR2000, Centre National de Référence des Mycoses Invasives et Antifongiques, Institut Pasteur, 75724 Paris cedex 15, France

BELINDA OSTROWSKY
Department of Medicine, Division of Infectious Disease, Montefiore Medical Center and Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York

S. MICHELE OWEN
National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

GRAEME P. PALTRIDGE
Canterbury Health Laboratories, Microbiology Laboratory, Christchurch 8011, New Zealand

XIAOLI PANG
Provincial Laboratory for Public Health and Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada

NICOLE PARRISH
Pathology, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland

ROBIN PATEL
Infectious Diseases Research Laboratory, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota

SHARON J. PEACOCK
Department of Medicine, University of Cambridge, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, United Kingdom

MICHAEL PENTELLA
University of Iowa, College of Public Health, Department of Epidemiology, Iowa City, Iowa

DAVID S. PERLIN
Public Health Research Institute, New Jersey Medical School, Rutgers Biomedical and Health Sciences, Newark, New Jersey

JEANNINE M. PETERSEN
Bacterial Diseases Branch, Division of Vector-Borne Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colorado

JOSEPH F. PETROSINO
Department of Molecular Virology & Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston, Texas

MICHAEL A. PFALLER
Departments of Pathology and Epidemiology (Emeritus), University of Iowa, Iowa City, and JMI Laboratories, North Liberty, Iowa

ALLAN PILLAY
Molecular Surveillance of T. pallidum Unit, Laboratory Reference and Research Branch, Division of STD Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

BENJAMIN A. PINSKY
Departments of Pathology and Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California

JOHANN PITOUT
Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Calgary, and Division of Microbiology, Calgary Laboratory Services, Calgary, Alberta, Canada

BOBBI S. PRITT
Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota

GARY W. PROCOP
Department of Laboratory Medicine, Pathology and Laboratory Medicine Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio

ELISABETH PUCHHAMMER-STÖCKL
Center for Virology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria

JUSTIN D. RADOLF
Departments of Medicine, Pediatrics, Immunology, Molecular Biology and Biophysics, and Genetics and Genome Sciences, UConn Health, Farmington, Connecticut

M. ALI RAI
Cincinnati Veterans Affairs Medical Center, Cincinnati, Ohio

RYAN F. RELICH
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana

L. BARTH RELLER
Departments of Pathology and Medicine, Duke University School of Medicine, Durham, North Carolina

DANIEL D. RHOADS
Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio

ELVIRA RICHTER
MVZ Labor Dr. Limbach, TB Laboratory, Heidelberg, Germany

SANDRA S. RICHTER
Clinical Pathology, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio

WINNIE RIDDERBERG
Qiagen Bioinformatics, Aarhus, Denmark

PIERRE E. ROLLIN
Viral Special Pathogens Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

JOSÉ R. ROMERO
Section of Pediatric Infectious Diseases, University of Arkansas for Medical Sciences and Arkansas Children's Hospital, Little Rock, Arkansas

PAUL A. ROTA
National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

KATHRYN L. RUOFF
O'Toole Lab, Department of Microbiology and Immunology, Geisel School of Medicine at Dartmouth, Hanover, New Hampshire

NORBERT RYAN
Bacteriology Laboratory, Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory, The Peter Doherty Institute for Infection and Immunity, 792 Elizabeth St., Melbourne 3000, Australia

JIRI G. SAFAR
Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio

MAX SALFINGER
Advanced Diagnostic Laboratories, National Jewish Health, Department of Medicine & Mycobacteriology Laboratory, Denver, Colorado

LINOJ SAMUEL
Clinical Microbiology, Henry Ford Health System, Detroit, Michigan

CARLOS A. Q. SANTOS
Division of Infectious Diseases, Rush University Medical Center, Chicago, Illinois

P. S. SATHESHKUMAR
Poxvirus and Rabies Branch, Division of High Consequence Pathogens and Pathologies, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

JULIUS SCHACHTER
Department of Laboratory Medicine, University of California, San Francisco, San Francisco, California

AUDREY N. SCHUETZ
Division of Clinical Microbiology, Department of Laboratory Medicine and Pathology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota

W. EVAN SECOR
Division of Parasitic Diseases and Malaria, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

RUTH HALL SEDLAK
Veterinary Medicine Research and Development, Zoetis, Kalamazoo, Michigan

ARLENE C. SEÑA
Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, and Durham County Department of Public Health, Durham, North Carolina

PARHAM SENDI
Institute for Infectious Diseases, University of Bern, Bern, and Department of Infectious Diseases and Hospital Epidemiology, University Hospital Basel, University Basel, Basel, Switzerland

ROBERT W. SHAFER
Departments of Medicine and Pathology, Stanford University, Stanford, California

SUSAN E. SHARP
Kaiser Permanente, Department of Pathology, Portland, Oregon

ROSEMARY C. SHE
Department of Pathology, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, California

HARSHA SHEOREY
Department of Microbiology, St Vincent's Hospital Melbourne, Fitzroy, Victoria 3065, Australia

PATRICIA LYNN SHEWMAKER
Streptococcus Laboratory, Respiratory Diseases Branch, Division of Bacterial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

WUN-JU SHIEH
Infectious Diseases Pathology Branch, Division of High Consequence Pathogens and Pathology, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

ROBYN Y. SHIMIZU
UCLA HealthSystem, Pathology and Laboratory Medicine, Los Angeles, California

PATRICIA J. SIMNER
John Hopkins University School of Medicine, Pathology, Baltimore, Maryland

KAMALJIT SINGH
NorthShore University HealthSystem, Department of Pathology, Evanston, Illinois

ROBERT L. SKOV
MVZ Synlab Leverkusen GmbH, Leverkusen, Germany, and Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark

MAREK SMIEJA
Department of Pathology and Molecular Medicine, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

JAMES W. SNYDER
University of Louisville, Department of Pathology and Laboratory Medicine, ULH, Louisville, Kentucky

TANIA C. SORRELL
Westmead Hospital, Infectious Diseases, Westmead, NSW 2145, Australia

BARBARA SPELLERBERG
Institute of Medical Microbiology and Hygiene, University of Ulm, Ulm, Germany

JENNIFER K. SPINLER
Department of Pathology & Immunology, Baylor College of Medicine, and Department of Pathology, Texas Children's Hospital, Houston, Texas

GEROLD STANEK
Medical University of Vienna, Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Institute for Hygiene and Applied Immunology, Vienna, Austria

KATHLEEN A. STELLRECHT
Department of Pathology and Laboratory Medicine, Albany Medical College and Albany Medical Center Hospital, Albany, New York

GREGORY A. STORCH
Department of Pediatrics, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri

RICHARD C. SUMMERBELL
Sporometrics Inc. and Dalla Lana School of Public Health, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

DEANNA A. SUTTON
Department of Pathology, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, Texas

WILLIAM M. SWITZER
Division of HIV/AIDS Prevention, National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

WENDY A. SZYMCZAK
Department of Pathology, Montefiore Medical Center and Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New York

YI-WEI TANG
Department of Laboratory Medicine, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, and Department of Pathology and Laboratory Medicine, Weill Medical College of Cornell University, New York, New York

JOANNA TANNOUS
University of Wisconsin-Madison, Medical Microbiology and Immunology, Madison, Wisconsin

CHERYL L. TARR
Enteric Diseases Laboratory Branch, Division of Foodborne, Waterborne and Environmental Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

LÚCIA MARTINS TEIXEIRA
Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

SAM R. TELFORD III
Cummings School of Veterinary Medicine, Tufts University, North Grafton, Massachusetts

KATE E. TEMPLETON
Royal Infirmary of Edinburgh, Specialist Virology Centre, Dept. Laboratory Medicine, Edinburgh, Lothian EH16 4SA, United Kingdom

ELITZA S. THEEL
Department of Laboratory Medicine and Pathology, Division of Clinical Microbiology
Mayo Clinic, Rochester, Minnesota

GEORGE R. THOMPSON, III
Department of Internal Medicine, Division of Infectious Diseases, and Department of Medical Microbiology and Immunology, University of California - Davis, Davis, California

JONATHAN S. TOWNER
Viral Special Pathogens Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

EIJA TREES
National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

CHRISTINE Y. TURENNE
Clinical Microbiology, Shared Health (Diagnostic Services), and Department of Medical Microbiology & Infectious Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

JOHN D. TURNIDGE
Adelaide Medical School, University of Adelaide, Adelaide, Australia

KERIN TYRRELL
Los Angeles, California

ELIZABETH R. UNGER
Chronic Viral Diseases Branch, National Center for Emerging and Zoonotic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

ALEXANDRA VALSAMAKIS
Roche Molecular Systems, Pleasanton, California, and Division of Medical Microbiology, Department of Pathology, The Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore, Maryland

WENDY W. J. VAN DE SANDE
Erasmus MC, Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, Rotterdam, The Netherlands

PETER A. R. VANDAMME
Laboratorium voor Microbiologie, Faculteit Wetenschappen, Universiteit Gent, Ghent, Belgium

MARIO VANEECHOUTTE
Laboratory Bacteriology Research, Department of Microbiology, Immunology and Clinical Chemistry, Faculty of Medicine and Health Sciences, Ghent University, Ghent, Belgium

ALIDA C. M. VELOO
Department of Medical Microbiology and Infection Prevention, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands

JAMES VERSALOVIC
Departments of Pathology & Immunology and Molecular Virology & Microbiology, Baylor College of Medicine, and Department of Pathology, Texas Children's Hospital, Houston, Texas

RAQUEL VILELA
Universidade Federal do Minas Gerais, Faculdade de Farmacia, Campus Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais CEP: 31.270.901, Brazil

GOVINDA S. VISVESVARA
Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia (Retired)

ULRICH VOGEL
Institute of Hygiene and Microbiology, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany

CHRISTOF von EIFF
University Hospital Münster, Institute of Medical Microbiology, Münster, Germany, and Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Germany

KEN B. WAITES
Department of Pathology, Diagnostic Mycoplasma Laboratory, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama

DAVID H. WALKER
Department of Pathology, Center for Biodefense and Emerging Infectious Diseases, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas

RICHARD J. WALLACE, JR.
The University of Texas Health Science Center at Tyler, Department of Microbiology, Tyler, Texas

DAVID W. WARNOCK
Atlanta, Georgia

DAVID M. WARSHAUER
Communicable Disease Division, Wisconsin State Laboratory of Hygiene, Madison, Wisconsin

RAINER WEBER
Division of Infectious Diseases and Hospital Epidemiology, University Hospital Zurich, University of Zurich, Zurich, Switzerland

MELVIN P. WEINSTEIN
Departments of Medicine and Pathology & Laboratory Medicine, Rutgers Robert Wood Johnson Medical School, New Brunswick, New Jersey

ANDREJ WEINTRAUB
Karolinska Institutet, Department of Laboratory Medicine, Division of Clinical Microbiology, Stockholm, Sweden

LOUIS M. WEISS
Albert Einstein College of Medicine, Pathology, Bronx, New York

PETER F. WELLER
Harvard Medical School and Division of Infectious Diseases and Allergy and Inflammation Division, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, Massachusetts

NELE WELLINGHAUSEN
Medical Laboratory Ravensburg, Infection Serology, Ravensburg, Germany

NANCY L. WENGENACK
Division of Clinical Microbiology, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota

MICHAEL L. WILSON
Department of Pathology and Laboratory Services, Denver Health Medical Center, Denver, and Department of Pathology, University of Colorado School of Medicine, Aurora, Colorado

FRANK G. WITEBSKY
Microbiology Service, Department of Laboratory Medicine, Warren G. Magnuson Clinical Center, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (Retired)

GAIL L. WOODS
University of Arkansas for Medical Sciences and Arkansas Children's Hospital, Pathology, Little Rock, Arkansas

LIHUA XIAO
College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou, China

PAMELA A. YAGER
Poxvirus and Rabies Branch, Division of High Consequence Pathogens and Pathologies, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

REINHARD ZBINDEN
Institute of Medical Microbiology, University of Zurich, Zurich, Switzerland

SEAN X. ZHANG
Division of Medical Microbiology, Department of Pathology, The Johns Hopkins Hospital, The Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, Maryland

译者前言

非常荣幸，我和百位同仁再次与中华医学电子音像出版社合作，对最新的美国第 12 版《临床微生物学手册》进行翻译和出版工作。

《临床微生物学手册》第 11 版中译本自出版以来，得到了国内临床微生物学检验同仁、临床医生、医学微生物专家、医学生、医药企业、美国微生物学会等各方的持续好评。大家一致认为，第 11 版中译本为国内广大同仁及从业者提供了巨大的帮助！这也是出版社和我们译者团队在短时间内重启该书最新版本翻译工作的强大动力。当然，第 11 版中译本也有些遗憾，如未列中文索引及一些细节错误等。第 12 版的翻译为我们提供了再一次学习和思考的机会，同时也弥补了上一版翻译时的遗憾和缺陷。真诚希望得到大家的进一步反馈、批评和建议。

第 12 版《临床微生物学手册》的翻译和编校工作历时 1 年，恰逢中国新型冠状病毒肺炎（简称新冠肺炎）疫情抗疫最艰难的时刻，很多译者奋战在抗疫一线。他们选择了无畏、逆行出征、白衣执甲。这精神激励着整个译者团队以更加顽强的意志、严谨的态度、满腔的激情认真推敲每一章、每一节、每一个新出现的名词。新冠肺炎疫情深刻地影响着我们，影响着世界，也影响着未来。但我们相信危机和机遇并存，诚如第 12 版《临床微生物学手册》的英文版主编所言：这是微生物学充满活力与动能的时代。我也相信国内临床微生物学同仁一方面是基于内在思考的逻辑深化，另一方面，也应因外部疫情的持续冲击，对微生物学将有更加深刻的体会与把握。在翻译、出版的过程中，我们的视野和理解与新一版的文字内容形成了富于建设性的碰撞，这碰撞的火花对推动我国临床微生物学的深入发展会有所助益！

再一次向美国微生物学会（ASM）出版社、中华医学电子音像出版社、多个学术团体（中华医学会检验医学分会微生物学组、中华医学会微生物学和免疫学分会微生物学组、中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会等）、编辑、译者、读者致谢！

大家共同学习第 12 版《临床微生物学手册》，共同推动中国临床微生物学的发展！再次向持续奋战在抗疫一线的白衣战士们致以崇高的敬意！

北京大学人民医院　王辉
二零二一年一月于北京

原著前言

《临床微生物学手册》(以下简称手册)是临床微生物学领域最权威的参考文献。这一版手册受益于写作团队(22位编委和300位以上作者)的整体智慧,并得到美国微生物学会出版社(ASM Press)卓富能力的出版团队的支持。本版手册是第12版,是第11版手册出版后经过4年出版周期的再版。所有编委都是美国微生物学会资深成员,是ASM出版社出版工作的强有力的支持者。我们继承了上一版手册编委和作者的计划思路,在满足《临床微生物学手册》读者预期的情况下,最大限度地保证该书的质量和时效性。很明显,本手册由我们两位共同主编是一明智之举。本手册的容量和视野,需要我们分工合作,以确保编辑过程的深度和速度。我们希望本手册的读者认识到,每一位编写者的卓越都与本手册息息相关。

在本手册50年历史上,我们是第六位和第七位主编。我们很荣幸可以追随前任的书籍范例,也很荣幸地获得前任主编 Patrick Murray、James Versalovic 和 James Jorgensen 的睿智建议。我们对 ASM 出版社资深编辑 Ellie Tupper 表示由衷的敬意,他在推动整个编辑出版过程中表现出了平稳的把控力。

这是临床微生物学充满活力与动能的时代。新技术(质谱、一代、二代、三代与下一代测序和其他分子生物学方法)深刻地影响了我们对微生物的检测、鉴定理念。本手册继续容纳经典的微生物学技术,如基础性的显微镜、培养,也包括上面提及的新方法。近来,一些微生物成为疾病的重要病因,这些微生物包括埃博拉病毒、寨卡病毒、肠病毒 D-68、产碳青霉烯酶的革兰阴性杆菌、多重耐药的真菌如耳念珠菌和多育节荚孢霉(*Lomentospora prolificans*)。本手册竭尽所能地涵盖了近来这些新发病原的最新信息。同样,分子分类的进步导致了细菌、真菌和原生寄生虫属和种命名的重要变化,这些也都体现在本手册中。而且,人类微生物组的持续研究更新了我们对正常微生物群落的理解,这些研究也提出了混合感染而非单一病原感染的可能性。

总之,对于参与并引领第12版手册的编辑出版,我们深表荣幸。我们希望本手册编辑委员会和作者们的努力能持续为临床微生物学相关群体提供有益的帮助。

KAREN C. CARROLL
MICHAEL A. PFALLER
王辉　译;陈民钧　审校

目　录

—— 第一卷 ——

第一部分　诊断策略和一般性问题

第二部分　细 菌 学

第三部分　抗菌药物和敏感性试验方法

—— 第二卷 ——

第四部分 病 毒

第五部分 抗病毒药物和敏感性试验方法

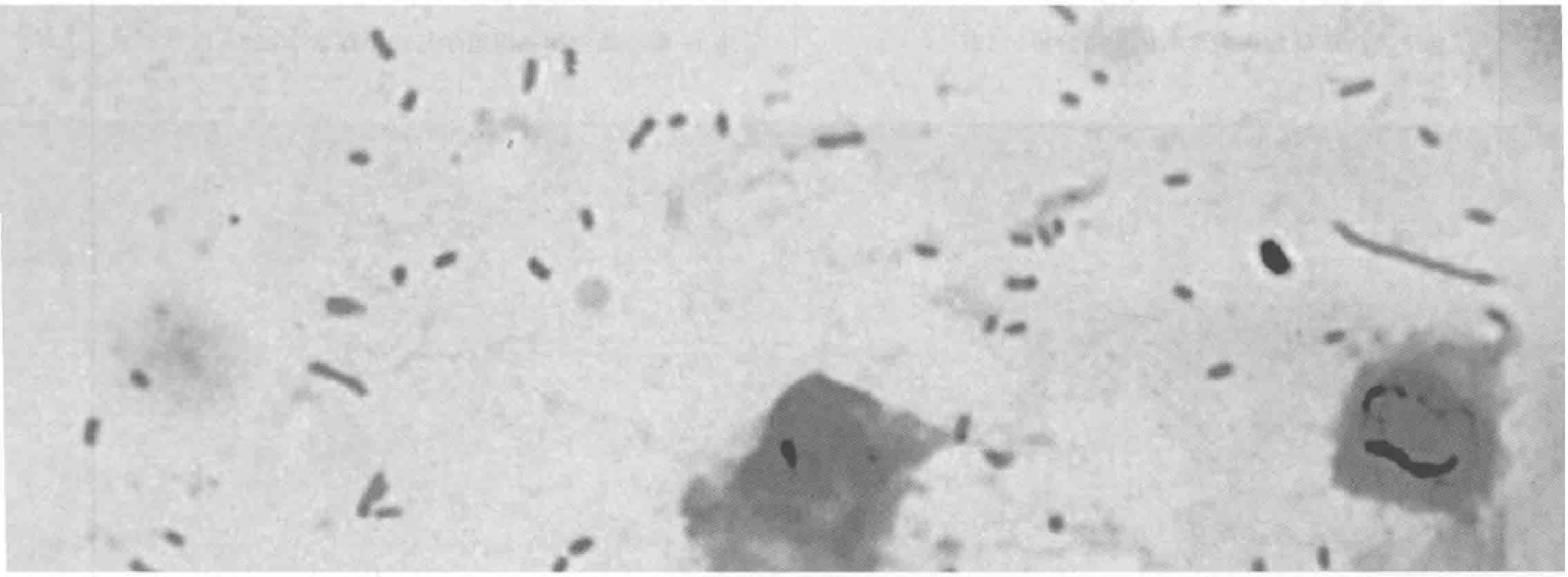
第六部分 真 菌 学

第七部分 抗真菌药物和敏感性试验方法

第八部分 寄生虫学

第九部分 抗寄生虫药物和敏感性试验方法

第一部分　诊断策略和一般性问题



第一部分　诊断策略和一般性问题

第1篇

总　论

第 1 章　第12版《临床微生物学手册》简介*

KAREN C. CARROLL, MICHAEL A. PFALLER

（王辉　译；陈民钧　审校）

这是一个属于临床微生物学家的最好时代，第 12 版《临床微生物学手册》(以下简称手册)的出版就是最好的证明！与第 11 版手册一样，第 12 版手册分为 2 卷，2 位总主编各负责 1 卷。Michael Pfaller 回归成为第 2 卷的总主编，而 Karen Carroll 接替 James H. Jorgensen，从卷主编"晋升"为第 1 卷的总主编。Jorgensen 曾参与本手册多个版本的供稿和编写工作。我们感谢他数十年来为本手册所做的贡献，并祝他退休后生活愉快。

第 12 版手册包含 154 章，近 2600 页。为了反映日益增加影响临床微生物学实践的规范问题，我们特设了一个名为"实验室认证和规范"的新章节。考虑到结核分枝杆菌分类学的扩展、耐药性的出现和新型微生物鉴定与耐药性检测方法的发展等因素，结核分枝杆菌复合群现与其他生长缓慢的分枝杆菌分别成章。第 3 个新设章节为"人类疱疹病毒 8"(human herpesvirus 8)，将它与其他疱疹病毒分开阐述。

除这些新章节外，第 12 版手册还涵盖了微生物学领域各个方面的最新内容。每一主题都由该领域世界级专家倾情提供，卷主编和部分(section)主编团队非常敬业，在常规的 4 年出版周期内如期完成编写工作。本版除了新总主编外，还新增了 2 位卷主编(Alexander McAdam、Robin Patel)和 5 位篇主编(Johann Pitout、Elisabeth Nagy、Carey Ann Burnham、James Karlowsky、Randall Hayden)。另 3 位卷主编 Marie Louise Landry、Sandra Richter、David Warnock 曾是上一版的编辑，而本版卷主编 Robin Patel 曾是上一版细菌学部分的篇主编。我们感谢重返的篇主编，包括第 1 卷的编辑 Jean Patel、Melissa Miller 和 J. Stephen Dumler，第 2 卷的编辑 Angela Caliendo、Christine Ginocchio、Yi-Wei Tang、Mary E. Brandt 和 Elizabeth M. Johnson。

第 12 版手册 1/3 的作者来自美国以外的国家，这确保了手册的世界影响力。有 101 位作者首次参与手册的编写。

第 12 版手册章节格式的整体编排与上一版非常相似。各章作者都对分类学、微生物组学、快速诊断和抗微生物药物耐药性及其检测等方面进行了适当的更新。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)在微生物鉴定领域的应用曾在上一版中有过介绍，目前许多实验室采用该技术。本版手册对 MALDI-TOF MS 在耐药性检测、患者标本直接检测和菌株分型等其他领域的应用进行了进一步探讨。更多关于分子技术的内容，包括二代测序(next-generation sequencing, NGS)，可以在分子微生物学、分子流行病学、微生物基因组学和病原的发现的章节中找到。虽然 NGS 还不能替代基于培养的检测法和标准的分子诊断检测方法，但是在一些特定的微生物学章节中仍然讨论了 NGS 对于检测和鉴定微生物的价值，尤其是那些难以检测的微生物。关于多重症候群组套检测(multiplex syndromic panel testing)的详细信息，可见于一些介绍性章节，并贯穿了几个特定微生物学章节，尤其在第 1 卷正文中，讨论了用于检测与肠胃炎、脑膜炎/脑炎和细菌性肺炎相关的病原体的复合症候群组套(comprehensive syndromic panels)，这些检测已通过美国食品和药品监督管理局(food and drug administration, FDA)审批，或正在审批中。

---

*注：本章包含 James H. Jorgensen 和 Michael A. Pfaller 在本手册第 11 版第 1 章中所呈现的部分内容

抗菌药物耐药性，特别是在革兰阴性菌中的耐药性，持续对微生物学实验室和临床医生构成挑战。目前，药物发现也呈现出前所未有的爆炸式增长，临床实验室需要做好准备。针对特定耐药机制如肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶的新型别，激动人心的抗微生物药物（如头孢他啶/阿维巴坦）现已上市，另有几种新品也即将问世。检测碳青霉烯酶表型的新方法，以及检测编码这种耐药性基因的分子平台，正在成为临床微生物学实验室必不可少的检测手段。第1卷第3部分所有章节以全面、实用的方式介绍这些试验，同时也介绍了美国临床与实验室标准协会（the Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI）和欧洲临床微生物和感染病学会药敏委员会（the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing，EUCAST）关于检测和报告的最新的推荐意见。

读者会注意到在本版中有许多新的属和种的名字。某些种是初次描述，而某些属和种被从以前的分类单元重新划分到一个新的或不同的分类单元中。这种调整是基于16S或23S基因测序结果、某些管家基因的测序结果或DNA杂交结果所揭示的新的系统发育关系。最显著的变化包括艰难梭菌[拟梭菌属（*Clostridioides*）]、痤疮丙酸杆菌和贪婪丙酸杆菌[皮肤杆菌属（*Cutibacterium*）]，以及产气肠杆菌[克雷伯菌属（*Klebsiella*）]的新属名。最新变化对报告和解释药敏试验结果具有重要意义。抗真菌药敏试验的进展包括引入种特异性的临床折点和流行病学界值，迫使实验室将念珠菌属和曲霉菌属准确鉴定到种的水平，以实现抗真菌药物敏感性试验结果的最佳临床应用效果。

一些新设定种属的微生物可能无法通过常规表型检测识别，也可能无法在FDA批准的设备数据库中找到。这些菌种可能需要基因测序，使用基因芯片或质谱来精确鉴别。真菌学中一个显著的例子是，业界知名的耳念珠菌是一种对抗真菌药物耐药的，且可以高度传播的微生物，目前只能通过分子或蛋白质组学方法来鉴定。由于了解临床重要微生物的最新特征对此类鉴定工作十分重要，这促使临床微生物学实验室要么采用新技术、要么更加依赖参考实验室。这种需要大量鉴定工作的特殊情况，为临床微生物学家和临床医生之间提供了对话的机会。

第2卷的编排与上一版手册基本相同。在第4部分（病毒学）中，亨德拉病毒（Hendra virus）和尼帕病毒（Nipah virus）从之前的章节并入第87章（“副流感病毒、腮腺炎病毒”），第87章还包括副黏液病毒科的其他成员。第109章突出了博卡病毒（bocaviruses）和细小病毒（parvoviruses），并且认识到博卡病毒自2005年发现以来已经作为人体病原体出现。

与细菌学章节一样，第2卷反映了分子分类领域的重大进展，这些进展导致许多微生物重新分类，并识别出几个所谓的“隐秘”物种，还发现一些“新”病原体。这些都归功于分子和蛋白质组学研究，它们找到了从研究到临床实验室的发展之路。真菌学和寄生虫学章节的大幅更新是基于多基因座系统发育分析（multilocus phylogenetic analysis），让我们极大地了解真核生物的进化，促使我们对许多不同真菌微生物的分类和命名进行不断地修订，并认识到许多在医学上重要的、遗传学意义上不同的真菌隐性物种。真菌命名规则也与新的分类学方法并行发展，形成了“一个真菌，一个名字（one fungus，one name）”的系统。寄生虫分类学最大的变化是不再僵化地使用复杂的分类单位（如目和门）对原生生物进行命名，而更倾向于在某个分类学水平上没有明确的分类名称。该系统是蛋白质学界最为广泛接受的系统，保留了许多熟悉的分类名称，如顶复动物门（Apicomplexa）、内阿米巴科（Entamebidae）和锥虫目（Trypanosomatida），以便于交流。

现在《临床微生物学手册》已经步入了它的第6个十年，我们将继续为打造引领临床微生物学“真实世界”实践工作的最权威的参考书而不懈努力。每个版本的创作和整合，都会借鉴之前版本的内容，精心策划、设计、编写和审查，加上后期编辑、组合、印刷、装订，整个出版过程需要大约3年时间。从接受章节原稿到印刷有1～2年的周期，在这个过程中，会出现一些新的诊断趋势、技术、病原体或感染性疾病的模式，这会影响到这本综合性参考书的时效性和针对性。任何权威机构在开展编写工作时都无法避免这个严酷的现实问题。但愿这本手册能继续成为整个临床微生物学领域推崇的基准和权威的参考。

《临床微生物学手册》的编写团队相信，在这

个大规模协作和快速沟通的时代，每一位读者都可以向我们指出错误、提出问题和提供下一版手册的趋势，为这一领域的未来作出贡献。知识没有止境，我们的工作也永远不会停止。感谢所有的编写者帮助我们扩充了知识量。让我们共勉，不断加强实践，为我们所珍视的临床微生物学专业的发展作出贡献！

第 2 章　实验室认可和规范

MICHAEL LOEFFELHOLZ, LINOJ SAMUEL, SUSAN SHARP

（朱镭　译；王辉、穆红　审校）

一、认可

目前的实验室资格认可体系始于 1967 年临床实验室改进法案(Clinical Laboratory Improvement Act of 1967, CLIA' 67)，该法案指导国家对参与州际贸易(interstate commerce)的参考实验室和在医疗保险/医疗救助项目中服务患者的医院实验室实行监管(https://wwwn.cdc.gov/CLIA/Regulatory/default.aspx)。这些法规强制实验室参加州批准或运行的能力验证(proficiency testing, PT)项目，并制定质量控制(quality control, QC)和人员能力标准。然而，CLIA' 67 (https://wwwn.cdc.gov/CLIA/Regulatory/default.aspx)仅要求 10% 的临床实验室需要达到联邦标准[2]*。20 世纪 80 年代后期，一系列媒体报道了细胞病理学实验室因人员培训和报酬不足导致的差错，促使美国国会采取进一步行动，通过了 1988 年的 CLIA 法案(CLIA' 88)[2] (https://wwwn.cdc.gov/CLIA/Regulatory/default.aspx)。根据 CLIA' 88，实验室定义为"以诊断、预防、治疗人类疾病、损害或评估健康提供信息为目的，对取自人体的材料进行检验的场所。这些检查还包括确认、测定或以其他方式描述体内是否存在各种物质或生物体的过程"(https://wwwn.cdc.gov/CLIA/Regulatory/default.aspx)。这项法案将所有进行临床试验的实验室，包括医生办公室、疗养院和健康展览会纳入了 CLIA 范畴。1992 年 2 月 28 日，整合多方建议的 CLIA' 88 最终法案出版，又在 2003 年 4 月进行了修订。CLIA' 88 明显加强了临床实验室的全方位监管，并基于实验室实施的检验项目技术复杂性提出了分层监管要求。

CLIA 计划由美国健康和人类服务部的以下 3 个机构监管。①医疗保险和医疗救助服务中心(centers for medicare and medicaid services, CMS)：CMS 负责实验室注册、执法、检查、评审机构执行 CLIA 计划。CLIA 的监管范围为对所有类型患者进行检验的实验室，不仅是医疗保险或医疗补助受益人。CMS 还负责其法规被认定等同 CLIA 的州豁免。目前，纽约和华盛顿的法案被视为等同于 CLIA。②疾病预防控制中心(centers for disease control and prevention, CDC)：疾病预防控制中心为卫生和人类服务部提供科学、技术支持和咨询服务。这是通过临床实验室改进咨询委员会完成的。③美国食品和药品监督管理局(food and drug administration, FDA)：FDA 负责体外诊断试验批准和分类。诊断测试分为豁免(免检)、中度复杂性(包括人工镜检)和高度复杂性 3 类。

(一)测试复杂性的分类和监管要求

简易测试由 FDA 批准，产品使用起来简单，可以家用，错误结果的风险可以忽略不计，且极小可能提供错误信息或在操作错误的情况下几乎不会产生伤害。仅进行简易测试的实验室需持有有效的 CLIA 证书，并确保在进行测试时遵守制造商说明书。如果有投诉或发现实验室正在进行非简易检验，则可进行督查。作为信息收集和教育工作的一部分，CMS每年对一小部分免检实

*译者注：为忠实原著，本书图表顺序和参考文献标引顺序均按原书顺序排序

验室进行检查。这是根据之前发现的执行CLIA免检测试的实验室中有很大一部分没有遵循制造商说明的情况而发起(http://oig.hhs.gov/oei/reports/oei-05-00-00251.pdf)。

对于执行中度或高度复杂性测试的实验室来说,CLAA'88要求更为严格。这些实验室必须加入CLIA计划,支付一定的费用,保证质量控制程序,参与获批供应商组织的外部能力调查,遵守人员资质要求,并接受认可机构的2年1次的评审。实验室执行高复杂度的测试,如实验室自主开发的测试(laboratory-developed tests, LDTs)或FDA批准检测的修改版本,对人员和质量管理提出了更高的要求。

人工镜检(provider-performed microscopy,PPM)测试属于中等复杂性的范畴,由医生、中级从业者在医生或牙医的监督下使用显微镜进行[1](https://wwwn.cdc.gov/CLIA/Regulatory/default.aspx)。

(二)CLIA证书

除了CLIA豁免实验室,CLIA要求所有实验室都有有效的CLIA证书。CLIA证书分为以下5种类型:①注册证书,允许实验室在经过CMS或其代理调查确定其满足CLIA要求期间进行中度和(或)高度复杂试验;②免检证书,允许实验室只进行豁免试验;③PPM程序证书,颁发给仅执行PPM程序和豁免试验的实验室;④合格证书,本证书颁发给经评审符合CLIA要求的实验室;⑤认可证书,由CMS认可的机构颁发的证书,用于确定实验室是否符合CLIA要求。

实验室可登录www.cms.hhs.gov/clia申请CLIA证书。仅进行简易或PPM程序的实验室不需要接受认可检查,但是如果存在不当行为指控或作为例行代表性抽样的一部分,可能会进行认可检查。

进行中度或高度复杂性试验的实验室需要定期接受评审。这些实验室可以选择由CMS国家检查员评审,或者由CMS认定的私营非营利机构评审。这些私营机构会被批准为认可机构,只要他们执行的标准等同于或超过CLIA的要求。该类机构还应按规定的频率检查实验室,并采用标化的标准,以便认可的实验室满足最低要求(https://wwwn.cdc.gov/CLIA/Regulatory/default.aspx)。通过CMS检查的实验室将获得合格证书,而经CMS下属机构检查合格的实验室将获得认可证书。以下机构为CLIA认可机构:

• AABB(前身为American Association of Blood Banks美国血库协会)

• 美国实验室认可协会(American Association for Laboratory Ac4creditation,A2LA)

• 美国骨病学会(American Osteopathic Association,AOA)

• 美国组织配型和免疫遗传学学会(American Society for Histocompatibility and Immunogenetics,ASHI)

• COLA(原名Commission of Office Laboratory Accreditation,办公室实验室认可委员会)

• 美国病理学家学会(College of American Pathologists,CAP)

• 联合委员会(Joint Commission)

截至2017年7月,CLIA共注册近25万个实验室。大多数实验室(超过180 000家)持有豁免证书,只有略多于16 000家实验室持有认可证书(图2-1)。其中95%以上是由CAP、COLA或联合委员会认可(www.cms.gov/clia)。

(三)认可

为了保持认可状态,在医疗保健中进行中度或高度复杂性测试的实验室必须每2年进行1次评审。由于希望实验室不断向规范化方向发展,而不是专门为预定的评审做准备,因此,评审不会事先通知。

评审的目的不仅是确定实验室是否符合法规要求,同时也是一次实验室学习提高自身检测质量的机会(https://www.cms.gov/regulations-and-guidance/legislation/clia/interpretive_guidelines_for_laboratories.html)。评审员应能进入实验室的所有物理区域,以及查阅与测试有关文件和协议。评审包括人员、培训和PT记录。评审员还可以检查质量保证体系(quality assurance,QA)和仪器校准、维护记录。鼓励评审员检查时不局限于文件和记录,而是在整个测试过程中跟踪样本,并与测试人员互动,以更好地了解实验室流程和人员培训的有效性。在发生处理不当或不遵守规定的举报的情况下,也可能进行飞行检查。

CLIA评审员可根据不符合项的性质,列出实验室的不足之处。缺陷可以是标准水平的或条件水平的。

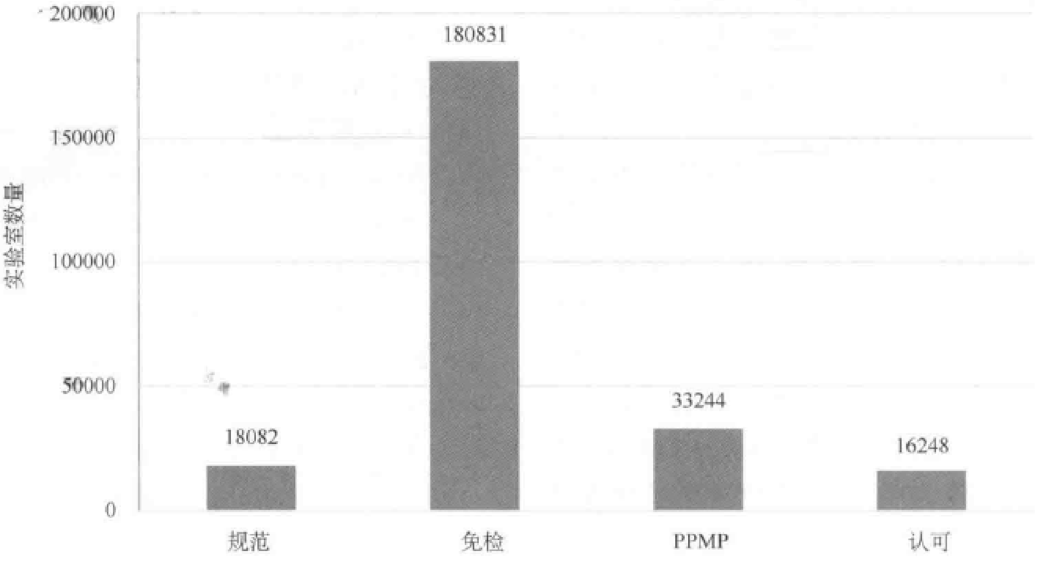


图 2-1 截至 2017 年 7 月，按 CLIA 证书类型划分的美国实验室数量

注：资料来源于 https://www.cms.gov/Regulations-and-Guidance/Legislation/CLIA/CLIA_Statistical_Tables_Graphs.html；PPMP. 人工镜检

标准水平缺陷（standard-level deficiencies）：这表示未遵守特定的 CLIA 法规。

条件水平缺陷（condition-level deficiencies）：这表示严重的错误，可能已经影响到患者医疗护理，或者如果不加以纠正，将来可能会影响到患者医疗护理。

通常情况下，实验室有时间对提出的不符合项做出响应并修正，条件水平缺陷 45 天内纠正，标准水平缺陷 1 年内纠正（https://www.cms.gov/regulations-and-guidance/legislation/clia/interpretive_guidelines_for_laboratories.html）。

认可机构，如 CAP 和联合委员会，可以选择少于 CMS 规定的响应期。但是，如果“由于实验室不符合 1 个或多个条件水平要求已经造成或正在造成，或可能在任何时候造成严重伤害，或对实验室服务人员、公众健康或安全造成伤害或死亡”，则实验室可被确定处于美国联邦法规（code of federal regulations，CFR）第 42 章第 493.2 节定义的“直接危险”中。这一术语与对人类健康有迫在眉睫的严重风险和对公众健康有重大危害同义（https://www.cms.gov/regulations-and-guidance/legislation/clia/interpretive_guidelines_for_laboratories.html）。根据 CFR 第 42 章第 493 条，CMS 可对不合规的实验室实行制裁，包括暂停、限制或撤销 CLIA 证书，每天或每次违规处以高达 10 000 美元的民事罚款、刑事制裁等（https://wwwn.cdc.gov/CLIA/Regulatory/default.aspx）。

（四）ISO 认可

在美国以外，各国监管要求因国家需求而异，但在寻求一个通用的质量管理认可体系的过程中，越来越多的实验室采用了国际标准化组织（international organization for standardization，ISO）的医学实验室专用要求。ISO 总部设在瑞士日内瓦，其成员包括 165 个国家的国家标准机构。ISO 以制定确保产品、服务或系统质量的标准而闻名，是国际上最大的标准化专门机构（www.iso.org）。医学实验室 ISO 15189 是 2003 年应 CLSI 的要求由国际标准化组织 ISOTC 212 技术委员会（临床实验室检验及体外诊断检测系统技术委员会）制定，2007 年和 2012 年进行 2 次修订[3]。ISO 标准涵盖实验室监督的不同方面，包括质量管理、分析前和分析后程序、分析测试性能、实验室安全、参考系统和质量保证。这些标准是由 CLSI 和来自 33 个国家的技术机构协商一致制定。

ISO 认可的主要侧重点不是具体的要求和规定，而是建立一个实施持续改进体系的质量管理体系。这是通过在测试过程中的所有阶段全过程中识别、跟踪和归类不符合项的识别来实现的，以

确定根本原因、实施纠正措施和监测变更有效性的途径辅之。需要进行例行审核以确保质量管理体系的有效性，并保证充分解决不符合项和顾客投诉。由于这些特性，ISO 15189 补充了其他质量计划，如精益六西格玛[4]（lean and six Sigma）。

与 CMS 管理的 CLIA 计划的不同之处在于，ISO 认证提供了标准，但并不保证被认证的实验室符合这些标准。第三方机构负责使用 ISO 标准对实验室进行认可（www. iso. org）。这些第三方机构参考由 ISO 合格评定委员会制定的最优 ISO 标准进行规范性评估。ISO 建议认证机构依据合格评定标准委员会标准，并由国际实验室认证合作组织（ILAC）认可（http://www. iso. org/iso/home/standards/certification. htm）。ILAC 认可不是 ISO 认可的必要条件，现在很多不在国际标准化组织认可的机构，例如，CAP 都提供 ISO 认可（www. cap. org）。实验室可选择由非 ILAC 认可机构（如 CAP）或 ILAC 认可机构进行 ISO 认可（www. ilac. org）。

虽然现在美国 ISO 认可由美国 CAP 等组织提供，但它不能代替 CLIA 的监管要求。ISO 检查评审通常以 3 年为一个周期进行，实验室在前 2 年接受监督检查，然后在第 3 年进行一次全面再认可复评审检查（www. iso. org）。CLIA 体系下的实验室认可检查评审员通常主要关注实验室的技术能力，而 ISO 评审检查员可以评估技术能力和质量管理体系，特别关注持续改进体系（www. cap. org，www. a2la. org，www. iso. org）。

在资源有限的时代，临床实验室很难同时遵守 2 种不同监管方案，但 ISO 认可可以提高临床实验室的效率，同时保持提供高质量患者护理的目标。

二、规范

(一)质量管理体系

每个微生物学诊断实验室都在一个质量管理体系的组织下运行，该体系由程序、方法、资源和组织结构组成，目的是始终如一地达到质量目标并保持管理规范性。

质量管理体系是完善的，它涉及所有人员，包括测试工作流程的所有阶段：分析前、分析中和分析后，其活动是有计划的、系统的、持续进行的，并运用质量指标。定期检查和分析测试数据，对不符合项进行识别、调查和解决。所有这些活动都要文件化。质量管理体系由表 2-1 概述的基本要素和活动组成。CLSI 指南 QMS01-A4《质量管理系统：实验室服务模型》详细描述了这些要素[5]。

表 2-1 质量管理体系的基本组成部分

质量管理体系组成部分	说明
组织	管理和分配资源；促进质量文化；制定目标和目的
以顾客为关注焦点	明确实验室客户的期望；测量客户满意度；记录及处理投诉
基础设施	空间、设施、保障、安全
人力资源	资格、培训、能力评估、继续教育
采购和库存	选择供应商、顾问、转诊实验室；库存的储存和跟踪
设备	选择、安装确认、校准、维护
过程管理	测试工作流程的设计和记录；验证/确认（设备、仪器、测试系统、计算机系统）；质量控制（包括 IQCP）
文件和记录	政策、程序、记录的管理
信息管理	数据的机密性、安全性、完整性；停机期间的意外事件
不合格事件管理	错误检测，根本原因分析，纠正和预防措施
评估	内部：审计、质量指标 外部：认可评审、PT
持续改进	识别和实施持续改进的机会

(二)质量控制

1. 概述 质量控制(QC)是质量管理体系的一个组成部分,用于评估过程和发现分析错误。QC包括选择和纳入合适的质量控制材料、建立可接受性能的标准、制定实施质量控制时间表、记录和评估质量控制记录。QC材料的不可接受结果是不合格事件的例子,需要调查和实施纠正措施。控制程序必须检测由于检测系统故障(包括操作员技能)或不利环境条件引起的错误。QC还必须跟踪测试性能的准确性和精密度。除非实验室对测试系统有一个个体化质量控制计划(individualized quality control plan,IQCP),否则操作程序必须在患者测试的每一天都执行质量控制,或者按照测试制造商的规定每天进行1次以上。定量程序需要1个阴性对照和2个不同浓度的阳性对照物质,定性程序需要1个阴性对照和1个阳性对照。对于产生效价结果的试验(如快速血浆反应素试验、免疫荧光滴度测定),阳性对照必须具有效价反应活性,其可接受性能通常在2倍稀释范围内。对于包括提取阶段(大多数分子程序)的测试,必须对其中一种控制材料进行萃取。此外,对于分子生物学方法,至少有一种控制材料必须能够检测到核酸扩增的抑制。必须检查试剂、着色剂、培养基和试剂盒的批次、批号和运输。这些要求对于新批次和材料装运的日常质量控制和质量控制有一些例外情况,在后述的IQCP部分中进行了说明。在对仪器进行重要的预防性维护或更换测试系统的任何重要部分(包括试剂)后,必须进行QC测试和评审。所有QC程序必须记录文件化,包括当控制结果不可接受时所采取的纠正措施。附加的和详细的质量控制要求在相应的法规中描述。实验室人员有义务了解并遵守这些规定。

2. 个性化质量控制计划 CLIA'67制定了规范实验室的指南,这些实验室执行医疗保险计费和(或)从事州际商业要求其遵守质量控制、PT、测试性能和人员标准。CLIA'88对所有执行实验室测试的实体人员标准、样品管理、QC、PT和QA做出了新规定。2003年,CMS发布了质量体系条例,更新了所有的质量控制要求。此次更新包括CMS所称的"等效QC测试"或EQC。EQC减少了诊断实验室的QC负担和成本,是CLIA默认QC(每天对患者检测进行两级控制)的替代方案,并使实验室在其整个QC测试过程中可以同时使用外部控制和内部控制。2011年,CLSI应CMS的要求,制定了一个QC评价方案,并在《EP23-基于风险管理的实验室质量控制》中发布[6]。本文件使用风险评估方法来管理政策、程序和实践,以完成分析、评估、控制和监控风险的任务。CMS将CLSI EP23文件的关键概念纳入了CLIA解释性指南,并于2014年宣布实验室可以遵守CLIA默认质量控制或制定所谓的"IQCP"(https://www.cms.gov/Regulations-and-Guidance/Legislation/CLIA/Individualized_Quality_Control_Plan_IQCP.html)。这2个选项适用于所有非豁免测试,并于2016年1月1日生效。尽管2015年5月发布的修订版CLIA解释指南中没有提及CLSI,但应注意的是,临床微生物学实验室仍然可以使用CLSI指南和EQC作为IQCP的组成部分。

CMS指出IQCP是一种灵活的QC选项,它提供了根据独特的测试环境和患者调整质控的机会,并将建立适当的质量实践,这将减少实验室发生错误的可能性。开发IQCP涉及对整个测试过程的审查,从标本采集(分析前)开始,一直到标本分析(分析中)后报告最终的测试结果(分析后)。IQCP有3个组成部分:风险评估、质量控制计划(QCP)和质量评估。作为每个测试系统IQCP的一部分,风险评估必须评估5个组成部分(标本、检测系统、试剂、环境和检测人员),还必须包括对可能发生的实验室错误频率和影响的评估。通过回顾历史数据可以确定错误发生的频率,但对这些错误造成的患者伤害的准确判断是高度可变的。在风险评估和QC可接受性标准之后,QCP定义了认为必要的QC结果。实施前,QCP必须由指定的CLIA实验室主任签署并注明日期,然后才能报告患者结果。需要注意的是,对于IQCP,由QCP定义的质量控制不能低于厂家推荐的质量控制要求。

最后,质量评估的设计应确保并积极监测质量控制计划的有效性。作为质量评估的一部分,如果实验室发现一个测试过程失败或错误,必须进行并记录调查,以确定故障或错误的原因,进行风险评估,并对质量控制计划进行适当修改,以控制该故障或错误。例如,微生物学IQCPs,由美国

微生物学会(American Society for Microbiology,ASM)联合 CAP 和 CLSI 共同开发,可以在ASM 网站上找到(http://clinmicro.asm.org/index.php/lab-management/laboratory-management/445-iqcp-iqcp)。另外值得注意的是,自2016年起,作为 CMS 认证机构,CAP 将 IQCP 的要求包括在其评审清单中。以下是各种微生物学试验的 IQCP 要求列表。

(1)需要 IQCP 的微生物学试验(包括流线型 QC),使用 EQC 和 CLSI 方法建立 IQCP。

- 直接抗原检测(非豁免)
- 快速分子检测
- 豁免培养基
- 抗菌药物敏感性测试
- 微生物鉴定测试(如自动和手动生化板、分子的血培养板)

(2)可以遵循 CLIA 默认 QC 或开发 IQCP 的检测。

- 革兰染色(每周)
- 抗酸杆菌染色(每次使用时)
- 荧光染色(每次使用时)
- 寄生虫永久性染色(每月使用时)

(3)可遵循 CLIA 默认 QC 的测试。

- 纸片法和快速生化试验,如杆菌肽、触酶、头孢硝噻吩、血浆凝固酶、金黄色葡萄球菌乳胶试验、芽管试验、邻硝基苯基 β-D-吡喃半乳糖、奥普托欣、氧化酶、吲哚、X 和 V 因子,吡咯烷酮芳胺酶(pyrrolidonyl,PYR)试验、卡他莫拉菌纸片法等(每批次和批号)
- 血清分型试验(每批次和批号,每6个月1次)

(4)不需要 IQCP 的测试。

- 自动化血培养仪
- 自动化抗酸杆菌培养仪

注意,这些仪器的培养基需要 IQCP,但仪器不需要。

(三)质量保证

1. 能力测试 尽管自1967年 CLIA 全面启动以来,PT 一直是 CLIA 的一项要求,但 CLIA'88 包含了对所有执行实验室测试实体的人员标准、样品管理、QC、PT 和 QA 的新规定。2003年4月,美国 CDC 和 CMS 发布了最终的 CLIA 质量体系实验室规范条例。根据 CMS,PT 是对未知的测试,该标本由 CMS 批准的 PT 项目发送到实验室(https://www.cms.gov/Regulations-and-Guidance/Legislation/CLIA/downloads/CLIAbrochure8.pdf)。大多数规定的 PT 调查每年分3次发送给参与实验室,通常每次活动包括5个项目。用与患者标本相同的方式测试 PT 样本后,实验室将其结果报告给 PT 项目提供者。经 CLIA 批准的认可机构或 PT 供应商名单见网址 https://www.cms.gov/Regulations-and-Guidance/Legislation/CLIA/Downloads/ptlist.pdf。一些认可机构,如 CAP,要求他们的实验室参与 PT,而不仅是应用 CLIA 规定的分析物。纽约和华盛顿在 CLIA 下享有豁免权利,因为 CLIA 判定他们的要求至少同 CLIA 一样严格。纽约要求实验室使用其内部 PT 计划,而华盛顿允许实验室使用任何经 CMS 批准的 PT 项目(https://www.mlo-online.com/clia-requirements-for-proficiency-testing-the-basics-for-laboratory-professionals.php)。这些经过批准的 PT 项目使用 CLIA 评分标准对结果进行评分,并发送实验室评分,以反映该实验室检测的准确性。实验室必须在5项测试中至少达到4项(80%)正确,才能被认为测试活动是令人满意的。CMS 和认证机构定期监控实验室的性能。

豁免测试不需要参与 PT。豁免测试的列表见网址 https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfClia/testswaived.cfm。PT 仅适用于第一部分"CLIA 法规非豁免测试的熟练度测试程序"中的"规定的"分析物(https://wwwn.cdc.gov/CLIA/Regulatory/default.aspx)。每一个单独的认可实验室(只持有豁免证书的实验室除外)都需要进行 PT 测试。PT 样本必须以与患者标本相同的方式进行检测,这意味着检测次数、测试时间与患者标本相同,由日常执行检测的相同人员进行,并使用常规用于患者标本的相同检测系统。重要的是要知道,对于某些 PT 样本,可能需要进行准备,或者在测试前与处理患者样本的方式不同。然而,在制备后,PT 样本必须以与患者标本相同的方式进行处理。此外,实验室不得以任何原因将 PT 样品送至另一实验室,这也可能与实验室处理患者标本的正常程序不同。同样,在提交截止日期之前,不得与其他实验室讨论 PT 结果。自 PT 事件发生之日起,PT 结果的副本必须至少

保存2年,任何因分数不合格而需要采取纠正措施的文件也必须保存2年。

临床微生物学实验室需要进行PT的检测包括细菌学(需氧/厌氧培养和鉴定、抗菌药物敏感性试验、直接细菌抗原检测和革兰染色)、分枝杆菌学(抗酸染色、分枝杆菌鉴定和分枝杆菌抗生素敏感性试验)、真菌学(培养鉴定)、寄生虫学(有无寄生虫及寄生虫鉴定)、病毒学(直接抗原检测、病毒分离和病毒鉴定)及血清学试验[梅毒、肝炎、抗链球菌溶血素O、人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV)、传染性单核细胞增多症和风疹]。

对测试评分的机制取决于分析物是定性的还是定量的。对于定性测试,参与者的结果必须与正确的结果相匹配,而正确的结果由所有参与实验室的一致意见决定,或者由至少10个PT项目选择的裁判实验室组成的小组确定。至少80%的一致意见被视为一项测试评分。对于定量结果(以数值形式报告的结果),可以使用参与者结果的总体平均值(剔除异常值后)来设置正确的答案,或者由至少10个裁判实验室确定正确的答案。如果在CLIA规定的可接受性能标准内没有至少80%的一致性,定量分析物将不被分级(https://www.mlo-online.com/clia-requirements-for-proficiency-testing-the-basics-for-laboratory-professionals.php)。

如果一个实验室在测试中没有达到至少80%的成绩,则认为其执行效果不令人满意(https://www.mlo-online.com/clia-requirements-for-proficiency-testing-the-basics-for-laboratory-professionals.php)。如果实验室对特定分析物偶尔出现不满意的PT结果,则不进行处罚。然而,不成功的参与定义如下:①在连续2次或3次PT事件中,同一分析物的测试性能不令人满意;②同一专业或子专业连续2次或2/3的PT项目的总测试成绩不合格;③在连续2次或2/3的PT事件中,未按同一分析物分级(即细菌学、分枝杆菌学、病毒学、寄生虫学、真菌学)评分的子专业的测试事件分数不令人满意。对于相同的分析物、子专业或专业,重复不成功的PT性能可能导致实验室在6个月内不再允许进行试验。如果一个实验室由于PT验证不成功而停止检测,要恢复常规的患者测试,必须首先证明已经明确了不成功的原因,纠正了不足,并且有完整的过程文档记录。实验室还必须获得有关分析物、子专业或专业连续2次成功的恢复PT检测结果。

正式的PT测试项目并不总是适用于实验室进行的所有测试,当正式的测试程序不可用但认可机构要求时,有必要采用其他方法来评估检测性能。根据CLIA'88,实验室必须有一个系统,每年至少验证2次试验结果的准确性。可作为替代PT的方法示例如下[7]。

(1)与另一个实验室分样检测:2个或2个以上的患者样本被送到另一个实验室进行结果比较。当2个实验室使用相同的试验方法时,这种替代方法效果最好,只要知道不同方法之间的关系(如特异性、单位差异等),它就具有可比性。

(2)内部分样分析:把单个患者的标本分成多个等份,实验室采用不同方法或不同操作者对结果进行比较。

(3)审查样本(audit-sample)分析:将单个患者样本分成多个等份,用相同的方法进行测试,并随时间的推移进行比较。等份在丢弃前只能使用一次。

(4)厂家产品校准仪分析:使用制造商提供的校准物或其他参考材料,其结果可追溯到参考材料或程序。该材料与内部校准所用材料必须属于不同的批次。

(5)临床相关性研究:回顾病历,将临床表现与实验室结果进行比较。这可能只适用于特定的诊断。虽然这种方法通常被认为是一种质量改进活动,而非研究,但可能需要机构审查委员会的批准才能使用。

一旦选择了替代PT方法,实验室必须确定项目数量和每个项目的标本数,分析并确定"正确"结果时标本类型,并制定报告格式。一旦测试完成,对于常规PT测试,实验室需审查结果是否可接受,识别不符合项,调查不可接受的性能,记录在调查中采取的步骤,确定并记录纠正措施,最后评估纠正措施的有效性。可从CMS网站www.cms.hhs.gov/clia或CDC获取有关PT的其他信息[8]。

2. 新试验的验证和确认 美国联邦法规要求诊断实验室在首次报告患者结果之前进行FDA批准或通过的实验室测试性能"验证"(CLSI、CAP和CMS使用的术语)(CLSI QMS01-A4,CLIAbro-

chure ＃2 https://www.cms.gov/regulations-and-guidance/legislation/clia/clia_brochures.html）。这些测试性能特性通常包括准确度（产生正确结果的能力）、重复性或精密度（重复产生相同或可比结果的能力）、可报告和参考（正常）范围（表 2-2）。对于许多微生物学实验室测试，可报告的范围只是简单的“阳性”或“检测到”。CLIA 规定，实验室必须验证其在低水平和高水平分析物下能产生正确的阳性试验结果。许多微生物学实验室测试的参考范围是“阴性”或“未检测到”。CLIA 规定要求实验室验证制造商的参考区间是否适合实验室的患者人群。

表 2-2 测试验证和确认过程的要素

过程要素	验证	确认
准确度（可单独包括诊断敏感性和特异性）	√	√
精密度/重复性	√	√
可报告范围	√	√
参考（正常）范围	√	√
分析敏感性（检测下限）		√
分析特异性/干扰物质		√
测试性能所需的其他性能特性	√	√

定量试验（如病毒载量分析）的其他性能特征包括线性[试验（在给定范围内）获得与样品中分析物浓度成正比的结果的能力]和分析测量范围（在此范围内试验产生准确可靠结果的范围）。这些规定的目的是为了证明，在每个实验室中，测试是按照制造商的期望进行。这一过程不需要重复广泛的多点临床评估；相反，通过适当组合的样品，实验室可以用少量的资源和时间验证测试的准确性、重复性、参考和报告范围，以及任何其他相关特性。

如果实验室对 FDA 批准或通过的试验进行了修改（包括但不限于预期用途、分析程序或结果解释的更改），或开发了本实验室（LDT）的检测方法，则需要“验证”（CLSI 和 CAP 使用的术语）来确定性能特征。需要更多的数据来确认性能特征。普遍的观点认为，如果不是直接的规定，应该测试更多的样本来确定性能特性，而不是验证 FDA 批准的测试的性能特性[9]。虽然一个由 20 个样本组成的小组可能足以验证未修改的经 FDA 批准或通过的试验的准确性，但可能需要一个由更多样本组成的小组来确定 LDT 或显著修改的试验的准确性（包括诊断敏感性和特异性）[9]。除了准确度、精密度、可报告性和参考范围外，还要求实验室确定改进试验和 LDTs 的检测限度（分析敏感性）、分析特异性和干扰物质（存在于患者标本中可产生假阴性和假阳性试验结果的成分，表 2-2）。

同样重要的是，应认识到“确认”和“验证”也可用于描述确定新批次、新到货试剂及新仪器性能的过程，并且这些过程不同于验证或确定新的和完整测试系统的性能所需的过程。一个完整的测试系统通常由试剂、质量控制、仪器（如适用）和执行测试的操作员组成。

3. 人员 CLIA’88 的目的是确保所有实验室测试都准确完成。实验室员工的培训和能力是确保患者获得高质量检测结果的基本要素之一。CLIA’88 规定了新员工培训和持续能力评估的性能和文件，以确保在测试患者样本之前，所有人员都有适当的学习和经验，就所提供的服务类型和复杂程度接受适当培训，他们被证明可以规范地执行所有测试操作，并提供和报告准确的结果[10]（https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx? SID＝1248e3189da5e5f936e55315402bc38b&node＝pt42.5.493&rgn＝div5＃sp42.5.493.m）。

（四）培训

《联邦法规》规定，技术主管负责确定培训需求，并确保每个执行测试的人都能得到定期的在职培训和教育（https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx? SID＝1248e3189da5e5f936e55315402bc38b&node＝pt42.5.493&rgn＝div5＃sp42.5.493.m）。CLIA’88 没有对初始培训提供特别指导，但最终取决于实验室主任，以确保所有员工在发布患者结果之前都接受了适当的培训。

CAP 在其通用检查表中规定，必须有记录表明所有工作人员已圆满完成了其指定工作所适用所有仪器或方法的初步培训。记录必须表明培训特别适用于每个员工执行的检测。CAP 还规定，当发现员工表现有问题时，必须进行再培训。CAP 还要求保留所有现有技术人员的人事档案，这些档案必须包括员工的培训和经验总结，对其当前义务和职责的描述，以及个人有权执行的检测程序，是否需要监督其样本处理、试验过程或结果报告，以及是否需要主管或主任审核其报告的

患者结果。

CLSI关于培训和能力评估的文件GP21-A3规定，必须为新入职或接受新工作项目的员工提供岗位培训，并通过工作流程和程序中的能力测试对培训进行评估[11]。该文件还指出，培训不仅应涵盖技术工作，还应包括安全、道德、计算机、规范性和品质方面的培训。本文件中指出的培训方式包括讲座、小组辅导、自学、演示、监督实践、自我评估结果和测试盲样或样本。

(五)能力评估

人员培训不等同于能力评估，培训文件也不能满足能力评估要求。培训发生在某人开始测试之前，而能力评估确认他们正确地进行了测试。《联邦法规》规定，技术主管负责评估所有检测人员的能力，并确保工作人员有执行测试程序的能力，且能及时、准确、熟练地报告检测结果(http://laboratory-manager. advanceweb. com/competency-assessment/)。

能力评估，正如CLIA'88所定义，必须作为实验室能力评估计划的一部分，包括6个方面：①直接观察患者常规检验表现；②监测检验结果的记录和报告；③审查中间试验结果、质量控制记录、PT结果和预防性维护记录；④直接观察仪器维护和功能核查；⑤通过检测先前分析的样本、内部盲测样本或外部PT样本来评估其表现；⑥问题解决能力评估。能力评估是确认培训有效和人员有能力进行实验室测试的手段。根据CLIA'88，测试人员的能力必须在检测患者样本的第1年每半年评估1次，之后每年评估1次。在实验室的测试菜单中添加新的测试方法、工具包和(或)仪器时，还必须进行能力证明和记录。在同一测试平台上同时进行的所有测试的能力评估可以合并；但是，同一测试平台中任何具有独特方面的测试都应该单独进行评估。

能力评估并不仅限于检验人员，也适用于CLIA法规M部分中所述履行下列人员职责的个人：临床顾问、技术顾问、技术主管和总主管。在能力评估中，要求临床顾问、技术顾问、技术主管和对患者样本进行测试的一般主管具备上述6个领域的能力。最后，实验室主任负责确保所有测试人员都能胜任并保持其能力，以便执行和报告准确可靠的测试结果。实验室主任的能力不直接评估，因为他们被要求遵守额外的标准和标准规章，以确认他们正在履行其职位的职责。

由于CLIA没有明确规定如何进行能力评估，因此可以采用许多最适合实验室的方法。只要这6种方法都得到了解决，就可以使用小测验、检查表、文档审查、PT和其他工具。但是，当CLIA要求指定“直接观察”时，就必须执行。对于能力评估，评估员必须在评估时签署评估文件并注明日期。

如前所述，能力评估必须形成文件，并将这些文件保存在人事档案中。文件必须说明是否证明了其胜任能力，如果没有证明能力，应采取什么纠正措施。纠正的成绩和记录是能力评估过程的一个关键组成部分。除非员工在工作中故意疏忽，否则纠正措施应该是有教育意义的，并以提高工作性能为目标有关初步培训和能力评估的其他详细信息，请参阅CLIAbrochure10，“我需要做什么来评估人员能力”[12](https://www.cms.gov/regulations-and-guidance/legislation/clia/clia _ brochures.html, http://laboratory-manager. advanceweb. com/competency-assessment/)。

投诉和差错调查 CLIA'88的问世部分是因为媒体报道了细胞学实验室的一些重大差错，这些差错对患者造成了重大伤害[2]。1999年，医学研究所关于医学差错的报告进一步突出了差错对患者护理的影响[13]。医学研究所的报告得出结论，许多患者由于医疗差错而死亡或遭受伤害。考虑到70%的卫生保健决策依赖于实验室结果，笔者有理由推测实验室差错在这些错误中占很大比例[14]。医学研究所的报告强调差错是由于系统缺陷造成的而非个人问题。尽管如此，在医学检验中，仍然缺乏一个明确的策略来定义、描述、跟踪和减少差错。差错可能发生在整个测试过程(total testing process，TTP)的任何阶段，包括从适当测试的选择和顺序到结果报告和解释的每一步。在这个过程的不同阶段，涉及不同程度培训人员的数量使情况变得复杂[15]。虽然通常认为实验室应对TTP负责，但实际上，只有TTP分析阶段经常直接由实验室监督。基于实验室的质量计划倾向于关注分析阶段中属于实验室领域的错误，而忽略分析前和分析后阶段。然而，临床药师的研究表明，70%的错误发生在分析前阶段。截至2017年，国家患者安全目标联合委员会的实验

室患者安全目标强调了实验室检测的分析前和分析后方面的重要性，如减少错误识别和及时报告危急值(https://www.jointcommission.org/lab_2017_npsgs/)。

随着时间的推移，临床化学实验室的错误发生率有了显著的降低[16]，但数据表明，分析错误虽仅占总错误的15%，但在24%～30%的病例中，分析错误可能对患者的护理产生不利影响[15-17]。关于临床微生物学中错误的发生率和影响的数据是有限的。Yuan等的研究表明，6.7%的校正后的微生物学报告具有不良的临床影响[18]。然而，目前还没有关于临床微生物学错误发生率的多中心综合研究。革兰染色错误的发生率已被记录在案，但这并不能解决微生物学实验室中的TTP问题[19]。当前微生物学标本处理的手工特性，加上革兰染色和培养物解释的主观性质，导致过程标准化的困难，增加了出错的可能性。由于非实验室人员不了解可能导致实验室错误的因素及其对患者护理的潜在严重影响，出错的风险进一步增加，包括分析前的错误，如不适当的测试选择和不正确的样本或样本采集。测试过程中固有的延迟，如与微生物学特别相关的培养所需的培养时间，会导致无法识别和记录这些错误。此外，对于临床微生物实验室中错误的定义或分类也没有明确的指导方针。缺乏标准化可能会妨碍实验室与同行进行性能对比。

ISO 15189:2012《医学实验室标准》包括1条关于实验室在监测和解决错误发生率方面的作用的条款。内容为"实验室应评估工作过程和潜在危险因素对检测结果的影响，如影响患者的安全，并应修改流程以减少或消除已识别的风险，并记录已采取的决定和行动"[4]。它着重强调了质量管理体系设立解决纠正和预防措施以减少错误的必要性，包括形成文件的过程，以解决测试过程所有阶段的不合格问题。可使用计划-执行-检查-行动(plan-do-check-act，PDCA)循环执行纠正措施(图2-2)[20](https://www.jointcommission.org/lab_2017_npsgs/)。使用PDCA循环可以确定根本原因，并监测纠正措施的影响，确定是否需要额外的干预措施。

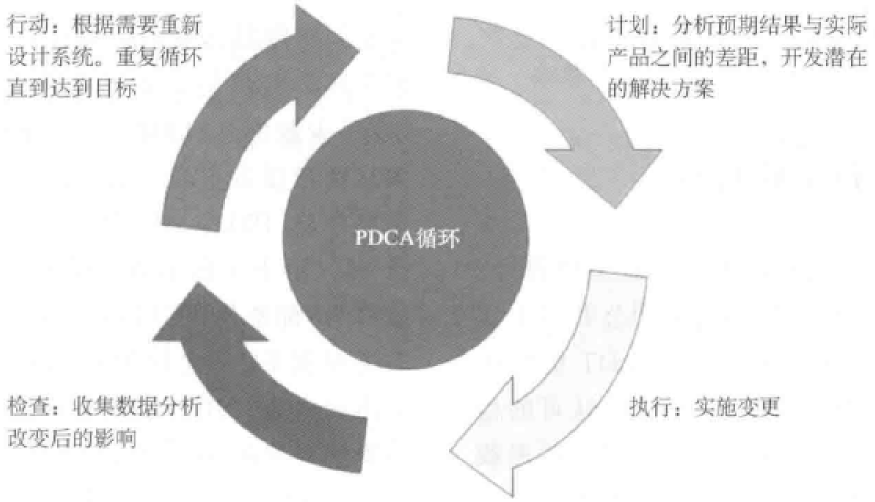


图2-2 PDCA循环(经Richard Zarbo博士许可引用)

除了ISO 15189，ISO于2008年发布的技术规范ISO/TS 22367描述了在ISO15189框架内通过风险管理采取预防措施的过程，作为减少实验室错误的一种途径[21]。ISO/TS 22367将实验室错误描述为"在实验室周期的任何阶段，从开具医嘱到报告结果和对结果的适当解释和反应，未能按预期完成计划的内容，或达到一个目标时使用了错误的计划"。根据ISO/TS 22367，实验室可以进行风险管理，使用风险矩阵通过发生率和严重程度识别和分层错误(表2-3)[21]。这种分析应该扩展到测试周期的所有方面，从测试选择到结果报告和解释。风险分析过程要求如下。

(1)由来自不同层次的个人组成团队，他们直接了解有问题的流程和可能发生的潜在错误。

(2)分析流程中的每个步骤或活动及其可能失败的原因。

(3)错误发生的可能性、严重性和潜在作用对患者护理的影响。

表 2-3 按频率和严重程度排列错误的风险矩阵示例[21]

概率	严重程度排名				
	可忽略	很小	严重	危急	灾难性
频繁	不可接受	不可接受	不可接受	不可接受	不可接受
可能	可接受	不可接受	不可接受	不可接受	不可接受
偶然	可接受	可接受	可接受	不可接受	不可接受
极少	可接受	可接受	可接受	不可接受	不可接受
从未	可接受	可接受	可接受	可接受	可接受

(4)关键故障的根本原因分析及预防措施。

一旦根据发生率和严重程度确定了过程中的潜在风险，接下来的步骤应该遵循 PDCA 循环。先建立一个适当的监测系统来跟踪一段时间内的发生率；然后可以采取纠正措施，并定期监测其影响，以确定解决方案。实验室应经常通过内部审核评估其风险管理策略的有效性，并应避免依赖于在没有特定目标的情况下监测的单个或多个指标。当达到既定目标时，实验室应重新回归进行风险评估，作为持续改进过程的一部分，以确定过程中的额外风险。随着时间的推移，这一过程在提高实验室结果质量方面应会产生促进作用。

三、LDTs 和 FDA 的监督

FDA 将 LDTs 定义为在单个实验室中设计、制造和使用的临床试验。许多临床和公共卫生实验室使用这些试验。在许多情况下，LDT 的使用是出于临床需要，因为没有 FDA 批准或认可的检测可用。例如，BK 病毒和 EB 病毒的定量病毒载量测定分析，以及节肢动物媒介的病原体血清学和分子检测。

从历史上看，FDA 一般不会对 LDTs 进行强制监督，因为它们相对简单，而且可用性有限，但是在过去的几十年里，LDTs 变得更加复杂，而且它们的使用迅速增加，包括在高风险应用中（主要是在传染病环境之外）。FDA 已对在一些 LDTs 中缺乏适当的控制程序和缺乏充分证据的预期用途表示了关注（https://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/LaboratoryDevelopedTests/default.htm）。因此，FDA 于 2010 年宣布重新考虑 LDTs 的执行自由裁量权政策。2014 年 10 月，FDA 发布了 LDTs 监管指南草案。该指南草案中指出，其拥有（自 1976 年以来）监管所有诊断测试的法律权力，包括制造的检测试剂盒和 LDTs。该指南草案描述了一种基于风险的 LDT 监管方法，即首先对高危 LDT 进行监管，然后在 9 年内逐步实施中等风险的检测监督。该指南草案立即引起了争议，体外诊断设备制造商普遍赞成 FDA 对 LDTs 的监管，而临床实验室则反对。

代表临床实验室、实验室专业人员、感染病医生的组织发表了反对拟议条例的立场声明，理由是它们将限制诊断创新，限制检测使用权，并且不利于医学实践[22]。如书面所述，指南草案将要求（除了少数例外）LDTs 作为设备在 FDA 注册，并服从医疗设备报告。高风险（Ⅲ级）LDTs 需要上市前申请（PMA），中等风险（Ⅱ级）LDTs 需要进行 510(k)上市前审查。即使是修改后的试验（也被称为"标签外"使用），包括样品类型的修改，也需要根据 FDA 建议的指南草案提交 FDA 进行上市前审查。代表实验室专业人员（如 ASM）和感染病专家的协会已经表明了这样的立场，即传染病 LDTs 是最佳患者护理所必需的，具有长期提供可靠结果的历史，并且可以通过其他方法安全地进行调节[22]。这些方法的前提是将感染性疾病 LDTs 适当分类为中度或低风险。根据 CLIA'88，CMS 将有法定权力监督低等和中等风险的 LDTs。此外，还有人提议进一步扩大对未满足医疗需求的豁免，如果修改后的标本类型不能满足需求，或者不太可能改变患者的诊断或治疗（称为有意义的临床影响），则可以免除 FDA 的监管。

2016 年底，FDA 宣布将推迟发布最终指导意见，提供进一步对话和起草立法的机会。为了促

进对话，FDA提供了一份讨论文件，描述了LDT监督的可能方法(https://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/LaboratoryDevelopedTests/default.htm)。该讨论文件不是FDA可执行的正式决定。列出了2014年指南草案的几种替代方案，包括对市场上已有的LDTs溯源、对"传统"LDTs豁免(使用合法销售用于临床的成分，其结果由人工解释)、低风险LDTs、LDTs罕见疾病及LDTs用于公共卫生监测。提出了FDA监管实施基于风险的时间表(表2-4)。本文还介绍了第三方上市前审查的使用，如纽约国家临床实验室评估项目。讨论的其他活动包括替代FDA审查的第三方(如纽约州临床实验室评估计划)LDTs上市前审查。但是，其中并不包括CMS。事实上，讨论文件详细强调了FDA和CMS提供的不同监督领域。

在撰写本章时，一份名为《诊断准确性和创新行动》的初步立法草案发布。根据这项立法，体外临床试验(包括用于商业销售的成品试剂盒和LDTs)的开发和验证将继续属于FDA的管辖范围，但这归属于一个新的中心，该中心只专注于体外临床试验监管。该法案试图解决2017年FDA讨论文件的诸多要素：基于风险的监管、避免FDA

表2-4 根据2017年1月13日讨论文件，基于风险法实施FDA对LDTs监查时间表

年	FDA活动
1	LDTs的严重不良事件报告，豁免试验除外
2	新的和改良的LDTs的上市前审查，其预期用途与FDA分类为高风险的体外诊断设备相同(上市前批审)
3	新的和改良的LDTs的上市前审查，其预期用途与FDA归类为中度风险的体外诊断设备相同[510(k)批准]
4	不属于上述类别的新LDT和改良LDT的上市前审查

和CMS的重复监管、过渡阶段等(https://bucshon.house.gov/media-center/press-releases/dr-bucshon-degette-release-draft-diagnostic-accuracy-and-innovation-act)。现行的指导或立法将对许多使用LDTs或改良试验的公共卫生和临床微生物实验室产生重大影响。对实验室而言，特别是2个要素——根据风险程度和特定检测或应用的豁免进行的LDTs分类，在产品上市前的审查要求上，可产生重大影响。

参考文献请扫二维码查阅

第 3 章　显微镜检查

STEVEN D. DALLAS

（孙立颖　译；胡志东、穆红　审校）

一、介绍

（一）显微镜检查简史

复合显微镜的发明归功于荷兰眼镜制造商 Hans 及 Zacharias Janssen 父子，但他们的显微镜只能放大 3～9 倍[1]。1665 年，英国的 Robert Hooke 出版了《显微图谱》，这是已知的第一本显微镜检查著作，此书叙述详尽并附有他自己设计的复合显微镜在 50 倍放大倍数下观察到的真菌和昆虫的图谱[1]。这本著作对那个时代的科学家们产生了深远的影响。大英图书馆在对此书的一篇评论中写道："通过改变我们的观察视角，Hooke 赋予了原本可能被视为恶心或琐碎的事物以力量和美感"[2]。1670 年，荷兰布商 Anton Van Leeuwenhoek 制作出了单透显微镜，其放大倍数比以前的复合显微镜大得多（70～250 倍），能够观察细菌和红细胞[1]。显微镜的设计和应用在之后的几个世纪里发展缓慢。19 世纪 70 年代，德国物理学家 Ernst Abbe 提出了计算光学显微镜的公式，并确定光学显微镜的最大分辨率为 200 nm，比细菌略小，他设计了改进的油浸镜头和照明系统，包括现在仍在使用的阿贝聚光器。10 年后，德国人 August Köhler 发展了他的标准照明技术[1]。在 20 世纪，荧光、相差和共聚焦显微镜得到了优化[1]。现代基础光学显微镜的外观变化很小，图 3-1* 标注了其组件。

21 世纪发光二极管（light-emitting diodes，LEDs）照明的改进，以及数字显微摄影和图像分析技术发展迅速。全玻片成像使得人们可以从计算机屏幕上进行虚拟显微镜检查[3]。当今，使用光学显微镜对标本和培养的微生物进行直接检查，仍然是临床微生物学的一个组成部分，是检测、鉴定和进行病原微生物药敏试验的第一步。本章目的是提出显微镜检查技术的应用和局限性的一些观点，描述光学显微镜的部件及功能，回顾特定技术和染色的应用，概述和优化一个在现行法规的背景下实用的显微镜检查质量保证计划，并展望了显微镜在分子和数字时代的应用前景。

（二）显微镜在分子时代的持续应用

在过去的 10 年中，直接标本的多重核酸扩增试验（所谓"从标本到结果"）已经渗透到临床微生物学的所有分支学科中，并且已经变得足够简单和相对便宜，使得所有实验室都可以进行。许多甚至可以作为即时检测（point-of-care tests）使用[4]。分子试验不能检测出所有可能的病原体，不能区分活性和非活性微生物，不能量化病原体的相对数量，不能区分定植和感染[5]，也不能对存在的正常微生物群进行检测或定量。除了少数情况外，他们无法预测病原体的抗微生物药物敏感性，也不能用于治疗效果的监测（"test of cure"），因为治疗后病原体的核酸能持续存在 3 周时间[6]。由于这些原因，对于正确采集和染色的标本，进行彻底的显微镜检查在分子时代仍然有很大的用处。标本直接革兰染色法仍然是最通用、最快速、花费最少的急诊多重"从标本到结果"微生物学检测方法，具有检测和鉴别人体细胞、细菌、酵母、真菌、分枝杆菌和一些寄生虫的能力。

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

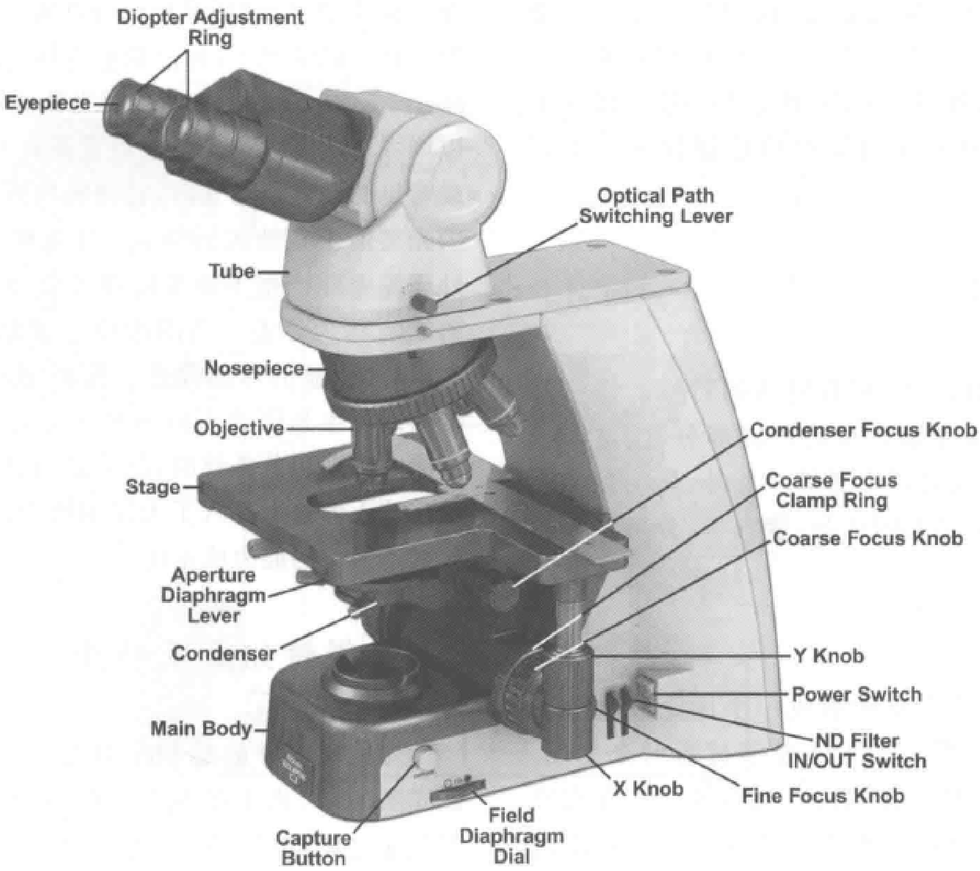


图 3-1 Basic upright light microscope with labeled components. Courtesy of Nikon Instruments Inc.

(三)局限性、敏感性和特异性

显微镜检查仍然是检测各种各样病原体的第一步,既可以直接从标本中检测,也可以观察从固体或液体培养基中分离到的微生物的形态。标本直接革兰染色检测针对细菌的检测限是每毫升液体或组织中存在 10^5 的微生物,大致相当于放大1000倍的每个油镜视野中有1个细菌[7]。液体标本采用细胞离心方法可以将检测限提高到 10^4/ml[8-9]。人体标本中的微生物含量通常很低,尤其是有隔膜的真菌和分枝杆菌。与培养和分子技术相比,标本直接显微镜检测最大的局限性是敏感性差。已发表的研究比较了革兰染色与培养方法的敏感性,但结果大相径庭,其原因在于其标本的质量和数量、标本的处理方式、所研究标本的种类、结果判读者的专业水平,以及最终在培养中鉴定出的病原体的不同[10-13]。许多微生物学标本均一性差,如痰标本,这阻碍了这些研究的进行。传统光学显微镜在临床微生物学中的第二个局限性是不能分辨<200 nm 的微生物[14]。

相比于培养方法,显微镜检的特异性可能也是直接标本检查存在的一个问题。微生物可能在标本直接镜检中被发现但无法生长,这可能由于先前的抗菌治疗或运输的延误,导致微生物无法在培养中生长。此外,厌氧菌或苛养菌如果不能满足适当的孵育时间或条件,也是只能看到而不能生长。螺旋菌或其他不常见的微生物可在显微镜下观察到,但无法培养。人工制品和残留的染液沉淀,特别是革兰染色中的结晶紫可能被误认为微生物。缺乏特异性可进一步定义为直接涂片报告的细菌的革兰染色反应与培养结果之间缺乏相关性。直接标本革兰染色报告为革兰阳性球菌,随后培养出卡他莫拉菌,就是缺乏特异性的表现,因为该微生物被检测到,但描述不正确。革兰染色可能出现脱色不足或被阅片者错误判读。革兰染色的特异性问题也可能是由于菌体本身的原因。例如,不动杆菌因其革兰染色的不确定性而闻名,通常在直接标本中表现为革兰阳性球菌或双球菌,但随后却培养出革兰阴性球菌或杆菌[12]。此外,芽胞杆菌属和梭菌属的细菌可能被染为革兰阴性杆菌,而不是革兰阳性杆菌[12]。革兰染色质量可能受到标本浓度和制片厚度变化的影响。

制片偏薄可能导致脱色过度，而过厚的涂片可能导致脱色不足。个人手法的不同，特别是脱色步骤的差异，可能导致染色结果的不一致。部分实验室通过使用自动化仪器对染色过程进行了标准化。

二、光学特性

可见光具有粒子、波和射线的特性。当光通过标本及显微镜光学系统的不同部分时，这3个特征就会改变，从而产生图像。此外，影响显微镜图像质量的3个主要因素是：放大率、分辨率和对比度[15]。

(一)放大

简单地说，放大是指形成一个比原来物体大的理想尺寸的图像。放大主要通过折射来实现，光线如同射线一样出现弯曲。折射率是光在真空中的速度和光在玻璃、水或油等介质中的速度之比。折射率越高，光的弯曲度越大。临床微生物学实验室常用的放大倍数是采用10倍目镜和10倍、40倍、100倍物镜，总放大倍数为100倍、400倍和1000倍。

(二)分辨率

仅仅提高放大率还不足以获得高质量图像。如果没有足够的分辨率，图像的细节仍然不清晰。分辨率，或称分辨力，是区分出独立实体的两点之间的最短距离。分辨率取决于物镜的数值孔径(numerical aperture)。数值孔径是物镜从聚光器收集光锥的范围，数值孔径越大，分辨率越好。高倍率物镜具有较大的数值孔径，因此具有较高的分辨率，但这是以降低景深为代价的，这就解释了为什么油浸显微镜需要频繁地重调焦距至1000倍。

(三)对比度

对比度是发现和清楚地看到样本表面或内部结构细节的能力。区分样品中明暗和颜色的差异也是对比度的作用。改变对比度最简单的方法就是将标本染色，以增强和区分细节。在不改变物镜数值孔径的情况下，通过调整光圈(又称孔径光阑，aperture diaphragm)来改变聚光器的数值孔径，也可以增强对比度。在光源上放置滤光片以改变颜色。最常见的是蓝色滤光片，它使钨丝灯或卤素灯发出的光类似于自然光的颜色。用显微镜的光学器件处理光可能产生不需要的图像效果。显微图像中的缺陷称为像差。当图像中心清晰，而边缘模糊时，即为明显的球面像差。色差(chromatic aberration)的产生是因为不同颜色的光折射不同。当在图像中出现彩色条纹时，色差很明显。显微镜制造商在校正像差上投入了大量的精力，而物镜的费用与校正像差的能力成正比。

三、显微镜组成及功能

显微镜组件的总和称为光学系统，起于显微镜底座的灯，止于观察者的眼睛(图3-2*)。当照明光通过显微镜底座到达人眼时，会多次改变方向。接下来将描述光学系统中各元件的功能及相关术语的定义。

(一)照明器

光线来源于卤素灯、钨灯或较新的LED灯。一个LED照明增加了约2000美元的显微镜整机成本，但大大增加了灯泡的寿命。光线通过显微镜底座上的一些初始内置滤光片并通过聚光透镜聚焦。

(二)视场光阑

光线然后从45°反射镜反射并穿过视场光阑(field diaphragm)。在部分显微镜中，视场光阑被放置在反射镜的前面。视场光阑决定了样本照明范围的宽窄，通过调整视场光阑使光线只落在视野内(科勒照明)。如果视场光阑被过度打开，散射光和反射光将会降低图像的质量。调节视场光阑并不影响分辨率、光强度或数值孔径。光线通过视场光阑后，会穿过一个位于视场光阑顶部的附加的中等灰度滤光片或日光(蓝色)滤光片。

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

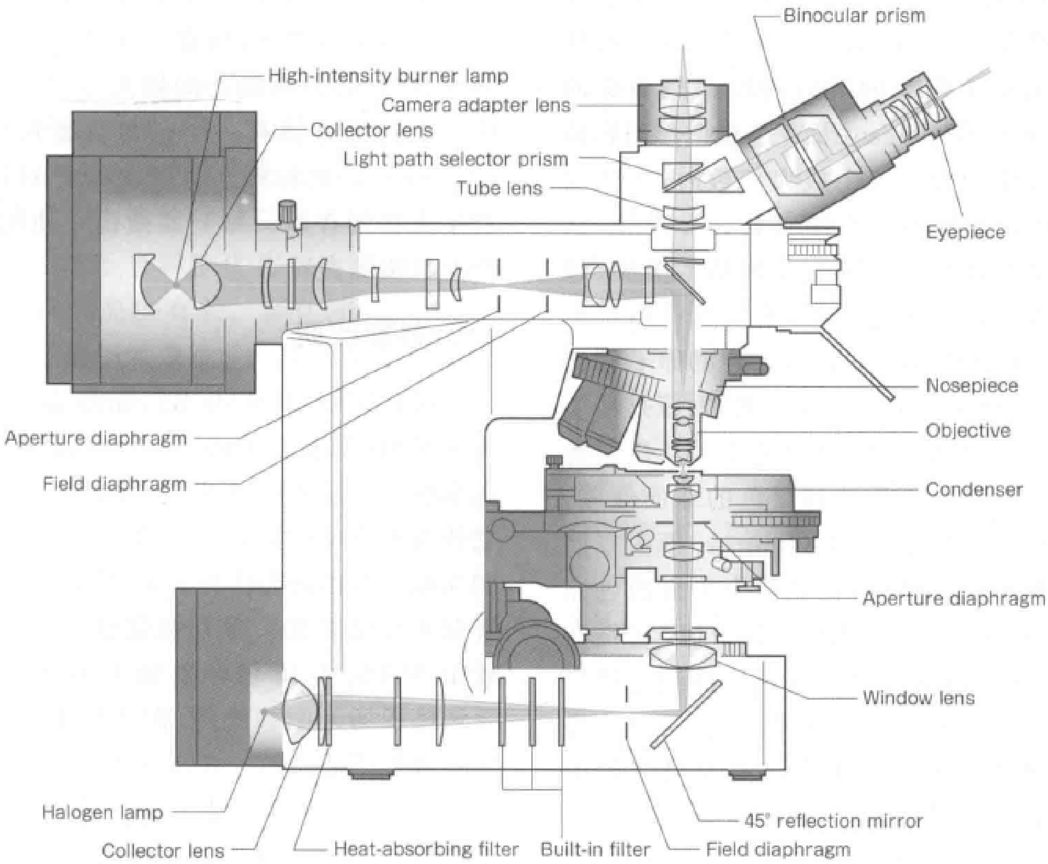


图 3-2　Example of a microscope optical train, including fluorescence module. Courtesy of Olympus Microscopy Resource Center

(三)聚光器

接下来，光线通过载物台下的聚光器内的光圈。光圈通过调节聚光器的数值孔径来调节分辨率和对比度。如果光圈缩小，对比度会增强，但分辨率和亮度会降低；如果扩大光圈，会提高分辨率和亮度，但会降低对比度。理想情况下，通过设定聚光器光圈环的刻度来调节对比度，使聚光器的光圈标尺位置为所用物镜数值孔径的 70%。聚光器的类型可能因需要而有所不同，但较新型的显微镜配备了通用的聚光器，以支持明场、暗场和相差观察。



图 3-3　物镜标注。物镜标注有下列信息：制造商、校正系数、数值孔径、镜筒长度、盖玻片厚度、工作距离和推荐的浸液介质。物镜若没有列出像差校正则被认为是消色差透镜。物镜没有列出浸液介质（油脂、矿物油、水、甘油）则被认为是干燥物镜，即在镜头和标本之间采用空气作为浸液介质

(四)物镜

光线继而会通过一个物镜。镜头是影响图像质量最重要的因素。物镜通常在两侧标记关键特征，这样显微镜使用者就能看到标签（图 3-3）。物镜有标准的彩色标码环，表示放大倍数和浸液的类型。此外，相差和偏振光的特殊镜头具有特殊的颜色标码。部分物镜有校正圈来补偿盖玻片的厚度，其他一些物镜具有一个内部的可变光圈来改变数值孔径以用于特殊用途。出于安全考虑，物镜的一个关键特性是具有弹性，是为了防止旋转物镜转换盘时物镜不小心碰撞到玻片而出现损坏。如要使用盖玻片，应考虑物镜应有足够工作距离。工作距离是指物镜的镜头与盖玻片或玻片

表面之间的距离。需要注意的是，应只使用#1½盖玻片(厚度为0.17 mm)。从同一制造商处为同一台显微镜所购买的所有物镜都是齐焦的(parfocal)和同心的(parcentric)，这意味着当物镜从一个放大倍数变为下一个放大倍数时，图像保持聚焦和居中。物镜及其应用存在许多变化，从中进行选择是困难的。物镜有3种基本类型，每一种类型都能纠正更多的偏差，然而其价格也按比例上升。消色差物镜(achromatic)也称平面消色差物镜(plan achromat)或“教育级”物镜是最便宜的，经常出现在基础教学显微镜上。消色差物镜校正了红色和蓝色的色差和绿色的球面像差，一般具有一个平面视场。萤石(fluorite)镜头在质量和价格方面属于“中档”，也被称为半复消色差(semiapochromats)或U型面萤石物镜，它是在颜色上校正红色和蓝色，对2种或3种颜色进行球面相差校正。校正产生了更高的数值孔径，提高了图像的整体质量。校正度最高且最昂贵的“研究级”物镜是平面复消色差(plan apochromats)镜头，它对红色、绿色和蓝色进行颜色校正，对2种或3种颜色进行球面像差校正。从实际临床微生物学实验室的角度来看，消色差适用于10倍和40倍的物镜，但强烈推荐一个最低限度的萤石/半复消色差镜头用于100倍油浸物镜。为了说明这3种物镜类型的相对费用，目前(2017年)，2家主要制造商的100倍油浸平面消色差物镜、U型面萤石物镜和U型面S复消色差物镜的标价分别为450美元、2100美元和6200美元。

离开物镜后，光线通过镜筒透镜，进入分光镜和双目棱镜，然后进入目镜。

(五)目镜

目镜，或称接目镜，是光学系统中最后一组透镜。这些镜头把最终的图像聚焦到观察者的眼睛上。目镜有3个变量：放大率、视点和视野数。与物镜相似，目镜上也标记有关键特征。临床微生物学室的常用放大倍数是10倍。视点，或称出瞳距离，是从镜头到眼睛的距离，是观察到整个视野所必需的距离。高视点目镜是戴眼镜的人进行观察时所必需的，通常标记有一个眼镜的图形或图标。视场数是在适当的视点上所见的视场大小。标准的视场数为20，这在入门级显微镜上很常见。视场数22是宽视场，而26.5是超宽视场。一般情况下，只有一个目镜包含屈光度调节环，这是补偿两眼之间聚焦差异所必需的。其中一个目镜可装有一个包含目镜测微计(ocular micrometer)的标线。目镜测微计对测量虫卵和寄生虫特别有用。每个显微镜在使用之前，应该校准目镜测微计[16]。

(六)科勒照明

科勒照明(Köhler illumination)是由奥古斯特·科勒(August Köhler)在19世纪90年代发展起来的[1]。这种技术也被称为双光圈照明，因为它涉及调节显微镜底座上的视场光阑和聚光器上的光圈。基本的操作方法有许多差异。有些程序要取下目镜并低头看着镜筒进行调节，有些程序指出当目镜从10倍调整到40倍或100倍时，需要调整视场光阑和光圈，但实际上这些步骤并不实际或是不必要的。在本章的末尾详细介绍了一种已建立的在医学实验室科学项目中行之有效的简明程序。程序包括初始屈光度和瞳孔间调整。如果设置正确，显微镜将显示一个明亮的、均匀照明且不刺眼的图像。光强通过灯的电压控制和(或)中性密度滤光片来调节，而不是通过升降聚光器。该技术是显微照相和长期使用显微镜的最佳选择。在拥有多个显微镜使用者的繁忙的临床微生物学实验室中，科勒技术并不常用。一种常见的替代方法是简单地根据情况改变光强度，使用1000倍油浸镜时调高聚光器接近载物台，使用10倍和40倍低倍观察时将聚光器向显微镜底座方向调低。一些实验室使用方便的顶透镜摆动式聚光器，这样整个聚光器在每次改变物镜时就不需要升高或降低。如果可行，强烈推荐使用科勒方法，因为它可以产生更好的图像，减少与眼睛疲劳相关的眩光。

四、显微镜类型及应用

(一)明场显微镜(包括油浸镜)

明场显微镜(bright-field microscopy)技术是临床实验室光学显微镜的基本技术。它包括穿过标本的透射光或从标本反射的光束。光束通常不会因应用滤光器或偏振光器而改变。明场是应用最广泛的一种方式，光线通过聚光器从标本下方

进行照明，从标本上方通过一系列物镜和目镜进行观察。光源可以是钨丝灯，在新型显微镜中也可以是LED灯。以LED灯为光源的显微镜比以卤素灯为光源的显微镜贵75%，但灯泡的使用寿命延长了6万小时。染色或未染色的标本在白色背景下显得明亮。图像的质量取决于标本的厚度和半透明性，另外还与调整优化放大倍数、分辨率、对比度、景深和亮度有关。直立、倒置和立体显微镜都使用了明场显微镜。一个常见的增强明场显微镜的方法是使用放大1000倍的油浸镜。浸油填充了载玻片与显微镜物镜之间的空气空间。没有油，光线通过空气到达物镜。空气的折射率是1.003。浸油将折射率提高到1.515，使物镜的数值孔径最大化，并产生从玻片到浸油和物镜的均质光路。部分显微镜允许在载玻片的底部和聚光器之间添加浸油，进一步增强了系统的聚光性能。

(二)荧光显微镜

荧光显微镜(fluorescent microscope)是在20世纪初发展起来的[1]。使用反射光荧光(落射荧光，epi-fluorescence)显微镜时载玻片上的生物体被特定波长的强激发光照射，典型的激发光来自100W汞灯或75W氙灯。光在水平方向通过照明器，继而垂直向下通过充当聚光器的显微镜物镜。然后，生物体通过释放较弱的发射光来“发光”，只有这种较弱的发射光才能返回到物镜中，被观察者看到。发射光的波长总是比激发光的波长更长，并且弱几个数量级。只要观察者在正确的焦平面上，就能很容易在黑色背景下看到发光效果。这项技术是通过对每种应用方案使用一组特定的激发和发射(阻断)滤光片来实现的(表3-1)。滤光片与二向色镜(dichroic mirror)(也称为分光镜)一起封装在光学模块或滤光片立方体中。显微镜上的转台中装有一系列用于多种用途的光学立方体。一般情况下，需要特殊的染色剂(荧光染料)，但有些生物如环孢菌在紫外光下会自己发出荧光。荧光显微镜的一个主要优点是提高了敏感性。例如，同时染色RNA和DNA的吖啶橙(acridine orange)染色剂，可检测浓度为每毫升10^4个细菌[7,9]，比革兰染色剂敏感一个数量级。使用仅对某些生物体有亲和力的染液，如针对抗酸杆菌使用金胺-罗丹明(auramine-rhodamine)，也增强了这项技术的特异性。另一个优点是，载玻片可以在低倍镜下快速扫描，只有在看到可疑的荧光结构时才切换到高倍镜。操作中必须非常注意要保持在正确的焦平面上。

表3-1 常用荧光染料的激发和发射波长[a]

荧光化合物	激发波长(nm)	发射波长(nm)
吖啶橙(单链核酸)	500	526
吖啶橙(双链核酸)	460	640
金胺O	460	550
钙荧光白	440	500~520
溴化乙锭	545	605
伊文思蓝	550	610
异硫氰酸荧光素(FITC)	490	525
赫斯特33258	352	461
罗丹明B	540	625
四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)	555	580

注：[a]激发和发射波长取决于溶剂和溶液的pH

除了吖啶橙和金胺-罗丹明染液，许多实验室使用真菌的钙荧光白染色法，各种直接荧光抗体技术，以及近期出现的荧光原位杂交技术。荧光显微镜需要一个可以变暗的房间、特殊的专业知识、试剂及昂贵的设备。荧光显微镜通常还需要特殊的荧光显微物镜(plan fluor)，这种物镜透射率高，视野平整度较强。汞灯和氙灯工作温度高，寿命短，更换时需要烦琐的校准过程。由于这些原因，荧光显微镜一般不用于较小的临床微生物学实验室。

这些技术要求很高，可能会导致眼睛疲劳。当把光束停留在感兴趣的结构上时间太长时，可能会发生荧光淬灭，缺乏经验的微生物学家可能会为此大为吃惊。须注意，不要将染色的玻片暴露在强烈的室内光线或阳光下。如果实验室考虑采用荧光显微镜技术，建议咨询试剂供应商和显微镜供应商。虽然荧光照明器可以安装在现有的明场显微镜上，但最好还是打包购买显微镜和配套的照明器、特殊物镜及滤光片。新型的紧凑型荧光元件利用了光纤，并且不需要烦琐的光源校准。LED荧光元件是另一种选择。这些设备价格昂贵，但产生的热量少得多，而且灯泡可以持续使用2万小时。在使用油浸镜时，要使用低自发荧光的镜油。用于复

查的染色后载玻片应在 4～8℃避光保存。

(三)相差显微镜

过去，相差显微镜(phase-contrast microscopy)要求使用绿色标注的特殊物镜，还需要一个特殊的聚光器。一些较新型的显微镜配备了通用聚光器，使相差显微镜使用更方便。相差显微镜技术复杂，涉及光的相位和振幅的变化[17]。直射光和折射光各自偏移相位的 1/4 波长，当直射光和折射光到达成像平面，它们的相位差变大为 1/2 波长，导致对比增强。相差显微镜已被应用于观察直接湿片和未染色的培养细胞，其标本本身是透明的。该技术增强了明暗对比来观察培养细胞的内部结构和病毒培养中常见的细微的细胞病变效应。随着毛滴虫和鞭毛虫等运动生物体的分子检测技术的广泛应用，以及在病毒学中用多重直接标本检测代替细胞培养，相差显微镜的实用性被削弱了。

(四)暗视野显微镜

暗视野照明(dark-field illumination)是利用一种特殊的干式或油浸式暗视野聚光器来实现的。一些较新的显微镜型号配备了通用的聚光器，使得暗视野显微镜使用更加方便。光线以斜角射入视野中的物体，没有直接光线，只有反射光线进入显微镜物镜。细菌在黑暗的背景下表现为明亮的生物体。由于这是一种湿片活体检测技术，可以观察到螺旋菌的螺旋状运动。暗视野显微镜曾作为一种急诊或床旁检测的方法来检测梅毒硬下疳和淋巴结中的梅毒螺旋体[18]。随着梅毒发病率的下降和高级血清学试验方法的出现，这种方法已不再作为常规检测方法。很少有临床微生物学实验室保留用于暗视野检查的显微镜。技术复杂性和缺乏能力验证及其验证用的材料也导致这种方法的消亡。

(五)立体/解剖显微镜(stereoscopic/dissecting)

用复消色差光学变焦的立体低倍显微镜对于检查较大的标本是必不可少的，如完整的蠕虫、绦虫节片、虱子、螨虫、节肢动物和昆虫，以及那些担心自己患病和患有寄生虫妄想症的人提供的假标本。典型的立体显微镜既采用透射光，也采用反射光照明，具有足够的景深和工作距离，使整个蠕虫或昆虫都能聚焦。一个可调节的镜子用于直接和倾斜的照明。新型号显微镜使用 LED 照明，并安装了相机。目前经常使用 1 倍物镜和 10 倍目镜，其变焦比为 7∶1或 10∶1，可提供多种放大范围。

五、特殊应用

显微镜技术可以直接在标本、培养的生物体或细胞培养物上使用。有些标本，特别是那些可能含有活动生物体的标本，是在新鲜液体状态下直接检验的。其他的，如脑脊液，在染色前要经过离心或细胞离心进行浓缩。镜检技术可以根据标本或培养的生物体是制成湿片还是干燥固定在载玻片上，以及标本是否染色，进一步进行分类。表 3-2 总结了在临床微生物学实验室中使用的更常见的技术，以及检测到的最常见的微生物。革兰染色法是一种应用非常广泛的染色法，它能检测细菌、酵母、真菌和一些寄生虫，还能区分人类细胞。其他方法都是小范围的应用。直接荧光抗体法和荧光原位杂交法都能检测和鉴定特定的生物。检测特定生物体的最佳显微镜检方法将在本书后面的章节中详细介绍。

六、质量保证

全面质量保证方法

直接标本显微镜检查具有可操作性，特别是在正常无菌体液或组织中。医生可以根据在脑脊液革兰染色中发现"革兰阳性双球菌"开始抗菌治疗，或根据在侵袭性毛霉菌病病例的氢氧化钾制片中发现的"无隔菌丝"缩小范围至抗真菌治疗。因此，显微镜报告应尽可能准确和及时，显微镜应包括在全面质量保证计划中。显微镜结果的质量取决于 5 个关键因素。适当的标本处理，在载玻片上放置充足的标本量，正确地固定和染色，由有能力的微生物学技术人员进行检查和解释，并采用开具检查申请的医务人员能够理解的格式及时报告。然后，培养结果应与显微镜检结果相关联。如果培养结果与显微镜检结果不相关，应立即调查并解决差异。在上面列出的 5 个因素中，只有 2 个可以通过自动化在一定程度上实现标准化。全

表 3-2 临床微生物学实验室常用的显微镜检测技术

技术	观察方法	显微镜类型	湿片/固定染色/不染色	标本	检测和鉴定的生物体或细胞
革兰染色	明场	直立	固定/染色	任何标本或培养的微生物	细菌、真菌、酵母、棘阿米巴属、微孢子菌、人体细胞
抗酸杆菌	荧光或明场	直立	固定/染色	呼吸道标本、组织、液体或培养的微生物	分枝杆菌、隐孢子虫、微孢子虫、等孢子球虫属
钙荧光白	荧光	直立	湿片/染色	任何标本	真菌,酵母,一些寄生虫
印度墨汁	明场	直立	湿片/染色	脑脊液	隐球菌
亚甲蓝	明场	直立	湿片/染色	粪便	炎性白细胞、红细胞
生理盐水湿片	明场	直立	湿片/不染色	阴道、粪便、培养的微生物	运动的寄生虫、酵母、真菌、人体细胞包括线索细胞,大体形态
KOH	明场	直立	湿片/不染色	阴道、皮肤、头发、指甲	真菌、酵母
三色染色	明场	直立	固定/染色	粪便	肠道虫卵和寄生虫
碘	明场	直立	湿片/染色	粪便	肠道虫卵和寄生虫
直接或间接荧光抗体	荧光	直立	固定/染色	呼吸道标本、皮肤损伤处、粪便或细胞培养	特异的病毒、细菌、寄生虫
吖啶橙	荧光	直立	固定/染色	阳性血培养、无菌体液	细菌、酵母
荧光原位杂交	荧光	直立	固定/染色	阳性血培养或培养的微生物	特异的细菌、特异的酵母
细胞培养	相差或明场	倒置	湿片/不染色	细胞培养管、小瓶、烧瓶	病毒细胞病理效应、单层培养细胞
立体显微镜	明场	立体	新鲜/不染色	蠕虫、节肢动物、人工制品	大的寄生虫、节肢动物、人工制品
乳酚棉蓝	明场	直立	湿片/染色	培养的真菌	真菌形态
瑞氏或吉姆萨	明场	直立	固定/染色	血液、脑脊液	疟疾寄生虫、纳格里阿米巴属
自发荧光	荧光	直立	湿片/不染色	粪便或其他体液	环孢子虫属、微孢子菌

实验室自动化系统可以使标本在载玻片上的制片标准化,自动化革兰染色仪可以使染色过程标准化[19]。所有其他因素都深受人为变量和错误的影响。一篇文献通过与培养进行比较,评估了多个实验室革兰染色错误率,但没有提出一个统一标准[11]。

七、监管要求

(一)显微镜检查结果与培养的相关性

全球超过 8000 个实验室获得了 CAP 认证[20]。在最近版本的微生物检查表中,CAP 已经纳入了关于显微镜检质量的项目。CAP 微生物检查单项目 MIC. 21530 明确规定使用革兰染色"对微生物进行初步鉴定,评价标本质量,指导培养工作"。该要求下面的注释指出,"要制定政策来处理直接革兰染色结果与最终培养结果的相关性问题。"这一要求并没有详细说明具体的方法,而是让各个实验室自行设计一种现场评审员检查者认为可以接受的方法。该要求也没有建立革兰染色与培养相关性的可接受错误率的标准。有一个标准认为革兰染色与培养相关性总体相关性为 90% 是合理的且可达到的(未发表数据)。该指标可以每月统计 1 次,并可作为实验室的持续质量指标。可以根据具体的培养类型和取材部位进一步评价镜检结果与培养结果的相关性。血培养和正常无菌体液应该给予最严格的审查,因为其存在潜在的患者不良后果[12]。

将微生物镜检结果与培养结果相关联的任务是艰巨的,特别是来自含有正常微生物群(呼吸道)或可能有混合微生物群(腹部或浅表伤口)的身体部位。虽然一些实验室信息系统可以通过编写程序来标记革兰染色与培养结果间的差异,但这些系统通常很烦琐,常常标记过多的涂片去复审。图 3-4 概述了一种简单的方法。该方法是在作者实验室发生了一次预警事件后开发的,该预警事件涉及由于错误的无菌部位革兰染色结果,导致不适当的抗菌治疗。作者将一个大型参考实验室一年的革兰染色与培养生长数据进行了关联分析并发现2个明确的相关性:如果培养物生

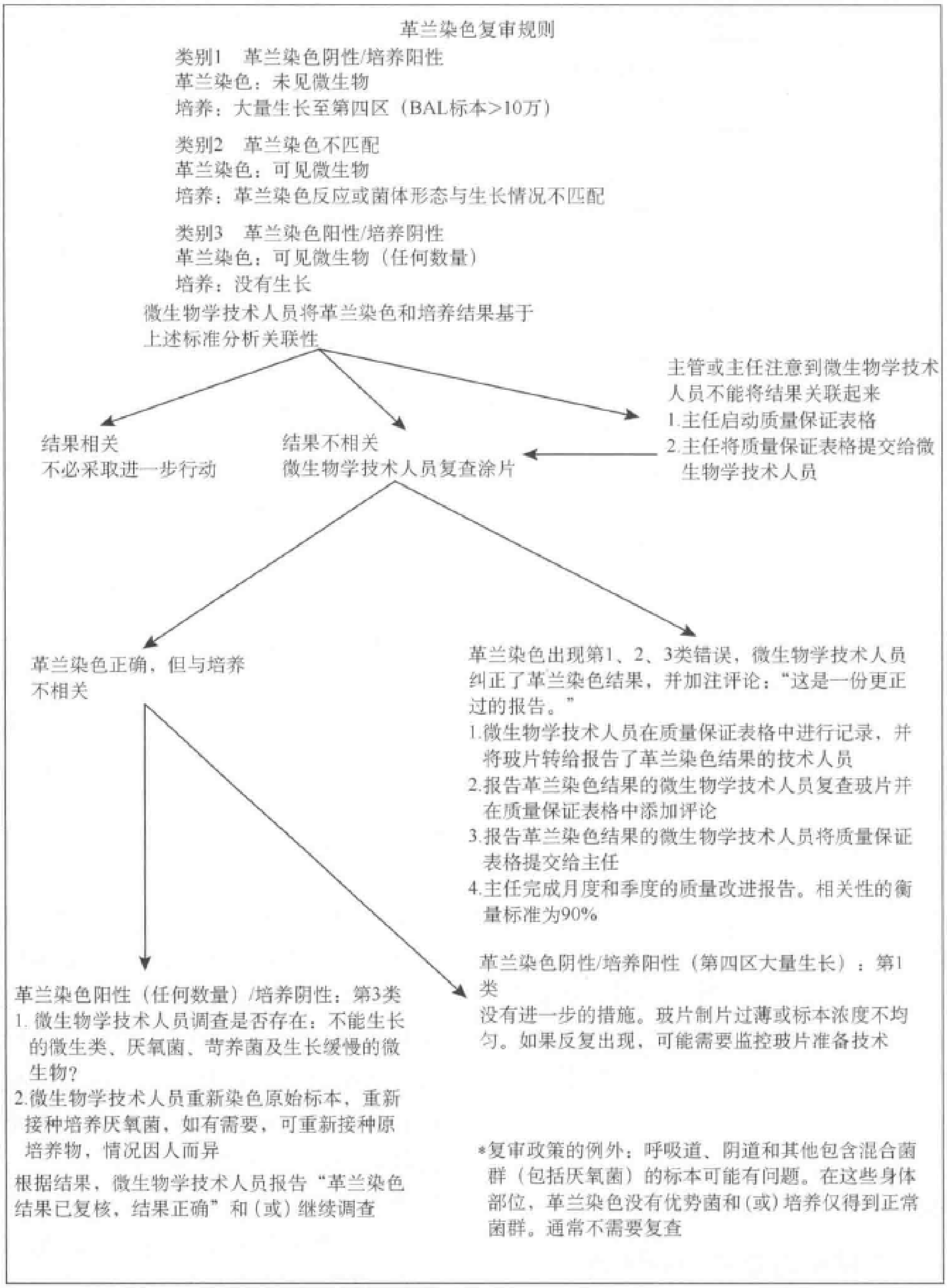


图 3-4 革兰染色复审规则

注：BAL. 肺泡灌洗液

长到第四区(大量生长)，则直接标本革兰染色有90%以上报告了相应的形态类型；相反，如果细菌只生长在第一区，那么在直接标本革兰染色中报告相应形态的不到10%(作者未发表的数据)。当定量培养的每毫升计数 >10 万个或<1 万个菌落形成单位时，也发现了类似的相关性。该研究结果将革兰染色与培养相关性的重任放在首次读取培养结果的微生物学家身上。微生物学家将镜检结果与培养结果进行关联，要识别出 3 种极端情况：镜检结果阴性，但培养结果阳性(尽管培养大量生长但没有看到细菌)；培养阳性、镜检阳性但细菌形态报告错误(看到细菌，但革兰染色着色或形态错误)；镜检阳性，但培养阴性(看到细菌，但培养未见相应的生长)。因出现上述差异情况的

不同，后续的调查处理方法也不同，但最好在初步结果报告给临床医生之前及时解决问题。

(二)显微镜检查能力的文件证明

显微镜检查能力是整体质量保证计划的一个组成部分。认证机构要求所有检测人员对所有程序进行能力评估并存档记录，进行此类项目标本检测的员工第1年内需半年进行1次评估，之后至少每年进行1次。评估需要包含6个要素[21]，简单地说，这些要素包括：①直接观察检测过程；②监控结果的记录和汇报；③审核检测中间环节中记录的结果、工作单、质量控制、能力验证和预防性维护记录；④直接观察仪器维修情况；⑤通过测试先前分析过的样本来评估试验性能；⑥评估解决问题的能力。通过结合革兰染色/显微镜复审规则，并通过保留标本和玻片，满足6个能力要素中的4个。CAP检查表中有2个项目专门针对显微镜检测能力。第一个在培养鉴定的背景下处理革兰染色报告。CAP微生物检查表项目MIC. 11060培养结果报告在"备注"部分中指出，"为该目的进行革兰染色的人员应进行能力评估。"CAP微生物检查表项目MIC. 11350形态观察评价中说："微生物学实验室至少每年对进行革兰、三色法染色和其他微生物染色的人员进行形态观察评估，以确保一致性。"

(三)建议玻片保留政策

一个成功的显微镜检查质量保证程序要求标本和(或)玻片保留一段合理的时间，以便进行可能的复审。美国病理学家学会实验室认可手册规定微生物学玻片必须保留至少7天。玻片保留政策应纳入部门程序手册。一种简单的方法是将染色的玻片尽可能放在靠近显微镜的地方，放入避光的"日盒"中，1周7天，每天放一个盒子，以便随时查看玻片。另外，玻片也可以按采集部位或工作台、工作站来排列。一些实验室可能还想保留一张未染色的备份玻片。随着固定在显微镜上的数码相机的出现，保存有代表性的图像成为可能。这对于不能长时间保存的湿片法和荧光法尤其有帮助。对于常见和不常见的结果，有条理地收集其玻片和(或)图像，以供培训和能力评估用。合适的参考文献应放在显微镜工作区。强烈推荐Lippincott Williams和Wilkins出版的《直接涂片图谱》[22]。这部书籍采用层压纸，环圈式活页装订包含超过250张直接标本革兰染色图片，所有图片均使用1000倍油浸镜放大。CAP出版了4本层压环圈式装订的工作台参考指南，其中包括用于革兰染色、寄生虫学、真菌学和节肢动物的彩色显微照片(http://www.cap.org/ShowProperty?nodePath=/UCMCon/Contribution% 20 Folders/WebContent/pdf/cap-press-catalog.pdf)。建议在实验室中至少安装一个双头显微镜，可以并排放，也可以面对面，以方便主管与员工之间的玻片复审和能力评价。以这种方式使用的双头显微镜可以满足CLIA对能力的3个要求：直接观察测试过程，通过测试先前分析过的样本来评估试验性能，以及评估解决问题的能力。

(四)附加的监管问题：服务提供者可操作的显微镜检查

在美国，微生物学实验室的管理人员和工作人员应该对服务提供者可操作的显微镜检查(provider-performed microscopy，PPM)的范围有一个大致的认识。PPM被定义为一组精选的9种中等复杂程度的显微镜检查，通常作为POCT项目，由医生、中级医生(护士助产士、护理医生或医生助理)或牙医进行操作[23]。值得注意的是，革兰染色被归类为高度复杂的试验，因此根据现行法规，卫生保健服务提供者被禁止进行这项检测[24]。PPM规则的目的是使卫生保健服务提供者能够方便、快速地对"迅速恶化或不易运输的样本"进行分析。CLIA规定了人员、培训、能力评估和安全要求[24]。实验室必须建立质量体系并接受CMS检查。最重要的是，实验室必须使用CMS-116表格通过一个申请流程来获得CMS发布的PPM程序的CLIA证书[23]。在一些机构中，卫生保健人员不了解这些规定，可能会寻求进入微生物学实验室，亲自对他们收集的标本进行显微镜检查。虽然这可能被认为是微生物学实验室与卫生保健服务提供者之间一种表示善意的方式，但根据CLIA的规定，应该禁止这种做法。

八、照相显微镜

近期数码照相显微镜(photomicroscopy)在质量、易用性和成本方面的进步，使得即使是很小的实验室也可以捕获静态和视频图像，用于存档、报

告、教学、出版和能力评价。图像也可以用于专家咨询。来自疑难病例的图片经常发布在Clinmicronet上,这是美国微生物学会赞助的为微生物实验室主任提供的论坛。美国CDC寄生虫病和疟疾分部将寄生虫图片发送给实验室人员和病理学家以提供诊断帮助。有关安全传输图像和患者信息的说明,请访问www.cdc.gov/dpdx。

图像捕获的基本要求是现有的光学显微镜具有用于相机安装的三目镜头,记录介质如USB设备,以及一个彩色显示器,所有设备放置在一个坚固的消振台面上,远离离心机和其他可能引起振动的设备。由于潜在的技术不兼容和故障,明智的做法是让供应商在需要安装相机的特定显微镜上现场演示潜在的新设备,利用特定的显微镜技术来捕捉图像。如果预算允许,将一个新的显微镜和数码相机作为一个系统购买,由供应商进行安装和培训是更好的选择。一些新型的显微镜在底部设有一个一键"图像捕捉"按钮。奥林巴斯(Olympus)、尼康(Nikon)和蔡司(Zeiss)生产高质量、简单易用的相机和专门用于显微镜的配件,提供现场演示和培训,并能针对兼容的电脑和平板电脑或宽屏显示器提出非常具体的建议。供应商还可以对图像分析和编辑软件提出具体的建议。数码显微照片可以用TIFF或JPEG格式获取。图像文件的大小为200万~1200万像素,适合大多数应用情况,包括出版物。随着以百万像素为单位的图像文件的增加,相机的成本也成比例地升高,但增加的百万像素并不能弥补在显微镜物镜或技术方面的不足。曝光设置、手动和自动、感光度设置、白平衡、锐度和变焦设置可能会根据应用要求的不同而有所不同,这与标准数码相机非常相似。比例尺可以叠加在图像上,用于记录文件大小及放大文件。荧光显微镜仍然存在问题,需要成本相对更高的照相机。

智能手机的摄像头

智能手机的摄像头很容易适应照相显微镜。通过练习和一些反复调试变焦和曝光设置的试验,智能手机可以获取高质量的静止和视频图像。对于那些手不够稳的人,有数家公司生产了通用智能手机适配器,将智能手机摄像头与显微镜目镜连接起来。这些图片可以通过智能手机轻松地进行缩放、裁剪和编辑。智能手机图像也可以附加到文本信息中,以便与其他卫生保健服务提供者和实验室主任进行即时咨询。应注意有关图像共享的注意事项。由于技术进步的速度快于立法,有关在移动设备上共享患者显微图像的HIPAA法规和安全规定仍在不断发展。

九、显微镜的维护保养

显微镜应该放置在坚固的、无振动的工作台上,远离灰尘、阳光直射和实验室化学物质(如溶剂)。显微镜不应放在有离心机或其他振动设备的工作台上。高效的方式是将计算机键盘和显示器放置在每台显微镜的旁边,以方便即刻输入结果。电源线应经相关批准机构(美国保险商实验室公司,Underwriters Laboratories,Inc.)认证,并定期检查是否有磨损或裂纹。电线应接在接地的三相电源插座上。应尽量减少显微镜在工作台之间的移动。理想情况下,显微镜和数码相机在不使用时应关掉并遮盖起来。显微镜应定期清洁和维护,并有文件记录。浸油可作为一种溶剂,会破坏光学装置的黏合剂,每次使用后应将其从物镜、聚光器和载物台上清除。不要让浸油黏在高倍干燥物镜或低倍镜上。要避免这种情况,可以将低倍镜安装在物镜转换盘的高倍镜和油浸镜之间,顺时针方向旋转物镜转换盘从低倍镜转至高倍镜,逆时针方向旋转则从低倍镜旋转到油浸镜。物镜转换盘上没有安装物镜的螺纹槽应该被堵住。应该只使用制造商推荐的清洁剂和镜头纸清洁镜头。每半年应该进行1次彻底专业的清洁。

十、人机工程学

使用传统的显微镜观察任何一段时间都会感到不舒服。在一项研究中,50%~70%的显微镜操作人员报告说他们的脖子、肩膀、背部、下背部、手臂、手腕、手和手指疼痛。据报道,20%~50%的人感到眼睛疲劳,60%~80%的人感到头痛,20%~35%的人感到腿和脚痛[25]。在进行显微镜检查时,有5个可变因素可影响到舒适感,即显微镜本身、显微镜放置的工作台、座椅、个人的姿势,以及休息之间进行显微镜检查的时间。在一个繁

忙的拥有多名员工的临床微生物学实验室中，为个人定制显微镜、工作台和座椅是不现实的，但是可以对每个可变因素进行调整，以最大限度地达到舒适和减少疼痛。管理层应该尽一切努力包容那些报告在显微镜检时感到疼痛的员工。购买新设备所花费的成本要低于缺勤、生产力下降和工人索赔造成的损失。部分医院的员工健康部门有人机工程学专家，他们可能会在说服管理层升级或购买符合人机工程学的设备方面提供很大的帮助。

购买一个新的符合人机工程学设计的显微镜或调整和修改现有的显微镜可以提升眼睛和颈部的舒适度。显微镜目镜应包括屈光度调整，以弥补较小的聚焦问题。许多显微镜的双目镜的高度可以调整。在显微镜上安装带有可调节长度的目镜的倾斜观察镜筒也是一种选择。高视点目镜可适用于员工在佩戴眼镜时进行显微镜检查。一个简单的解决方案是简单地在实验室的每个显微镜上安装一个数码相机和相应的电脑显示器，这样就省去了通过目镜观察的麻烦。这种方法需要一些视觉上的调整，因为图像是矩形的而不是圆形的，而且不像目镜那样显示整个视野。

不适当的显微镜工作台高度会引起人机工程学上的不良效果，导致弯腰和肩膀疼痛。模块化，可调节的工作站，而不是固定的个体工作，可实现高度灵活性。Kewaunee Scientific 公司提供了一种可调节的座椅，只需按一下按钮，就可以将座椅在28～44 英寸(1 英寸＝2.54 厘米)之间升降。RDM 工业产品提供类似的带手摇曲柄的工作台及更昂贵的版本，这个版本对每个工作台高度的设置有记忆功能。其他制造商也提供类似的产品。一个较便宜的方法是使用售后市场制作的显微镜底座来升降显微镜，而不是调节整个工作台。可调底座也允许前后调整以倾斜整个显微镜，获得更好的观察角度。

Fisher Scientific 公司和其他多家制造商都可以生产符合人机工程学的可定制的实验室座椅和凳子。他们生产有腰部支撑的、可调节高度和角度、扶手及脚踏环的气动调节座椅。一个尺寸或品牌当然不适合所有要求，但一些制造商热衷于提供样品进行演示。腕部休息软垫对于一些显微镜工作人员是有帮助的，许多供应商都有售。

正确的体位是确保无痛显微镜检查最重要的变量。奥林巴斯和尼康的网站有很好的显微镜人机工程学的资源，以下提示是从这些网站浓缩提炼而来[25-26]。员工应该谨慎地采用从上到下的身体姿势，包括眼睛、颈部、背部、手臂、手腕、腿和脚；显微镜目镜应该在眼睛下方，眼睛向下看的角度是 30°～45°；屈光度和瞳孔间距应调整舒适；颈部和头部应微微弯曲，不要超过 10°～15°；显微镜工作人员应根据需要调整椅子，后背尽量挺直而坐，但要稍微向前倾斜，椅子的腰部支撑背部，椅子的上部支撑肩胛骨；上臂垂直于地面，肘部紧贴身体；前臂应与地板平行，手腕应伸直；注意要在椅子上坐好，对大腿后部施加压力；脚应平放在地板上或放在脚踏板上。达到上述姿态需要时间和练习。尽管看起来会有点尴尬，但请同事帮忙纠正观察显微镜检的姿势很有帮助。

最后，显微镜工作人员应该有规律地休息，每小时 5～10 min[26]。散步、伸展运动和关注远处的物体有助于减轻身体和眼睛的压力。在一些实验室里，可能会确立一种公平的劳动分工，这样就不会出现一个人在显微镜前待上一段不舒服的时间。

十一、总结

尽管分子微生物学最近取得了进展，但对标本的显微镜检查仍可能是未来诊断过程中的一个关键组成部分。与目前任何复杂的分子检测相比，对正确采集的标本进行急诊模式的革兰染色速度更快，检测的病原体范围更广。湿片检查虽然与分子试验相比不敏感，却是检测念珠菌、毛滴虫或提示加德纳菌的线索细胞的一种快速、方便的方法。当结核分枝杆菌复合体的 PCR 检测为阴性时，痰抗酸染色可快速检测到明显的抗酸性微生物。

未来的显微镜可能会有一个集成的视频监示器，传统的目镜作为备选的功能，减少身体和眼睛的疲劳。通过实时图像处理实现连续自动对焦、图像稳定和扩展对焦深度将极大地改善图像的观看效果。LED 和荧光模块的小型化将拓宽显微镜检查技术的范围。

显微镜检查、解释和结果的实际位置有待讨论。2017 年，美国 FDA 批准飞利浦 IntelliSite 公司的全玻片成像系统主要用于病理学诊断，这种

方法可能对微生物学产生深远的影响[3]。从本质上讲，一个完整的显微镜玻片可通过多个平面聚焦扫描，存储在云计算系统中，任何人在任何地方都可以通过电脑屏幕对结果进行查看和解释。观察者可以放大和缩小、做记录、截取图像，并为返回查看设置标志。这项技术正在等待 FDA 批准用于微生物学，它可能会将微生物学技术“专家”的角色扩展到那些不具备解释 CLIA 高度复杂试验的专业知识的卫生保健机构中。

附录

科勒照明过程

科勒照明的目的是通过调整视野和聚光器光圈，使视野得到均匀的照明，并通过聚焦和居中光路来优化标本的对比度和分辨率。

每天在使用显微镜之前和维护显微镜之后执行此程序。

1. 打开显微镜，把亮度控制旋钮调到舒适的水平。

2. 确保聚光器直接置于载物台正下方。如果不是，用聚光器旋钮将聚光器升起。

3. 将 10 倍物镜旋转到位。确认目镜屈光度环设置在零屈光度。

4. 将用于科勒照明系统的质控片（瑞氏染色的血涂片）放在显微镜载物台上。

5. 调整瞳孔间距，使右眼和左眼的图像重合在一起。

6. 使用粗调焦旋钮来聚焦 10 倍物镜。用细调焦旋钮调整。

7. 切换到 40 倍物镜，用细调焦旋钮调整。

8. 回到 10 倍物镜。

每个目镜需要根据个人的视力要求进行调整。这是通过步骤 9 完成的。

9. 闭上左眼。用右眼看右边的部分。使用右目镜屈光度聚焦视野。用左目镜重复这个过程。

10. 用视场光阑环将视场光阑关闭到最小的开口。

11. 将聚光器上下移动，直到视场光阑的图像清晰可见。这通常需要将聚光器移近顶部。

12. 通过调节聚光器托架上的 2 个定心螺钉，将视场光阑的图像居中。

13. 慢慢打开视场光阑直到它刚好从视野中消失。

14. 用细调焦旋钮微调。

15. 完全打开聚光器光圈。

16. 部分关闭聚光器光圈，直到背景颜色稍微变暗至合适的程度，或将聚光器光圈的开放与物镜的数值孔径相匹配，通常将光圈的打开程度减小到数值孔径的 70%～80%。

参考文献请扫二维码查阅

第 4 章　细菌血症和真菌血症的实验室检测

MICHAEL L. WILSON, MELVIN P. WEINSTEIN, L. BARTH RELLER

（胡志东　译；孙立颖、穆红　审校）

建立血流感染（bloodstream infections，BSI）的病原学诊断方法是临床微生物实验室的重要任务。因为细菌血症（bacteremia）和真菌血症（fungemia）导致的死亡率高达 12%[1]，而快速、准确、可靠的细菌血症或真菌血症诊断对患者治疗及其预后至关重要。尤其是血培养结果可以指导抗生素治疗和后续的手术治疗、拔除导管的方案和其他的临床干预措施。此外，细菌血症和真菌血症诊断需要多种而不是单一的检验方法。诊断需要在不同部位取血，行多次血培养、分离病原菌鉴定、抗菌药物敏感性实验，并结合其他的临床表现、影像学和实验室检查结果进行解释分析。

本章旨在概述细菌血症和真菌血症的临床重要性，介绍当前诊断方法的科学及医学原理，总结可替代的诊断方法。近来出现的一些方法是对传统的基于培养的检测方法的有益补充，甚至可以替代传统的培养鉴定法。本章将对这些方法进行简要评述。

一、目前血液中微生物的检测方法

目前，还没有一种方法可认为是检测血液中细菌或真菌的最佳标准。几十年来已公认的是，对高度怀疑为细菌血症或真菌血症的患者，即使依照最优化的方法采集血标本，并选用最好的系统培养，通常也只有 8%～12%的血培养可以分离出微生物，而且其中 1/4～1/3 还可能来自皮肤定植菌的污染。这种低阳性率的缘由并不清楚。最可能的原因是由于许多血培养的血取自这样一群患者——他们正处在菌血症或真菌血症的低风险期，甚至零风险期。最近的研究显示，应用包括客观临床和实验室风险因素的贝叶斯（Bayesian）预测模型进行分析，在大量的患者中真正的菌血症患病率可能为 0.4%～18.4%，平均患病率为 6.9%[2]。其他的原因还有：①血培养量不足；②许多患者在采集血标本时正在接受经验性抗生素治疗，因而降低了血培养的检出率；③患者机体暂时清除了血中病原微生物；④标本处理不当（如未及时培养）导致假阴性结果；⑤标本中的一些微生物在肉汤基质的血培养瓶中不能被检出；⑥标本中微生物的含量太低，以致用目前的方法不能检出。

长期以来对分子生物学方法寄予厚望，希望它能提高诊断细菌血症或真菌血症的敏感率，而事实并非如此。正如下面要评论到的，一些分子生物方法学方法甚至还没有培养法敏感，而有些分子生物学方法可在非细菌血症或真菌血症者体内误测到核酸。此外，血液中某些蛋白质在某些核酸扩增试验（nucleic acid amplification assays）中起着抑制剂的作用。

有研究曾企图采用组合标准，即综合不同方法的结果作为标准。从统计学角度来讲，这种方法是有缺陷的，因为任何给定的分析都不能和自身比较（作为金标准的一部分）。此外，成为金标准的核心是须在许多不同研究中都能使用它；这些“组合的”金标准分析很快被排除。最明显的理由是，每一次评估中都用多种方法作为标准是不切实际的，并且实验方法也会随时间而发展或者退市，这也使得它们不能成为组合金标准的成员。

综合以上所有原因，尽管都有各自的缺陷，血培养方法仍然只能是诊断细菌血症和真菌血症的不完美的金标准。

二、诊断的重要性

选用血培养作为诊断实验最重要的目的是要

确诊患者细菌血症或真菌血症，以及后续的病原菌鉴定和抗菌药物敏感谱测定，而血培养中病原菌的鉴定和分离模式为感染部位和感染类型提供了重要诊断线索。感染部位和血培养分离出的何种病原菌之间有着紧密的联系[3]，它给医生提供了关于感染性质的重要信息。然而，血培养也存在缺陷，即高于 29%的血培养分离菌并不能确定其感染来源[1]。

三、预后的重要性

总归因死亡率中约有 12%住院成人患者死于细菌血症或真菌血症。当感染部位、护理级别和其他可变因素参与进一步的患者分类时，死亡率幅度会有很大变化[1,3]。单以门诊患者作为一个分组，血培养分离病原菌对预后的重要性还不是很清楚，其原因有：①缺乏对照研究；②很多细菌血症或真菌血症患者已病重到足可收住院而成了住院患者。此外，多价肺炎疫苗和 B 型流感疫苗(haemophilus influenzae type B Vaccines)的接种使得儿童社区获得性细菌血症(community-acquired occult bacteremia)的患病率减少或消除。已公布的数据显示，患有非复杂性肾盂肾炎或其他单纯性感染的菌血症患者，他们不需要后续的住院治疗，血培养结果的预后价值和诊断价值都很小(甚至没有)，故通常不需要做血培养[4-8]。即使是在社区获得性肺炎(community-acquired pneumonia，CAP)的住院患者中，有选择性地进行血培养分析也是一种有效的方法[9]。很多近期的研究结果表明，对于门诊患者或者重症监护病房的患者，应该在其他临床表现和实验室检查的基础上，选择性地进行血培养分析[10-11]。

四、关键因素

在过去的 40 年中，一些研究确定和阐明了从细菌血症或真菌血症患者分离出了病原菌的最重要因素，其中许多因素至今仍很重要，而另一些因素在今天看来只有历史意义了。下面的章节中将阐述现在仍然重要的那些因素，需要强调的是，从血液标本中分离病原菌的最佳方法需要满足所有的因素，而不是单一因素。

(一)血培养量

对于成人和大龄儿童，血液采集量是从血培养中分离出病原微生物的最重要因素。采集量对于幼儿也很重要，但实际上这部分患者血量有限，以致被迫放弃某些试验，其中包括血培养[12]。经研究得出的重要结论，即血培养总采血量和分离病原菌的可能性之间有着直接的关联[12-16]。此研究结论经常是用不同厂家的培养瓶和培养系统在有对照的临床评估下完成的，因此，也促进了当今应用的市售产品不断改进。许多研究的结论是，成人血培养每次应采 2 瓶，每瓶 8～10 ml 血液，总共 16～20 ml 血液每套。这项监测还发现，在细菌血症或真菌血症的败血期，应采集 2～4 次血培养，这意味着要抽取 80 ml(4 次血培养，每次 20 ml)血液才最有利于发现病原菌。虽然认为采血量很大，特别是在住院患者中，他们通常需要采血进行其他实验室检测，但是，要确诊患者是否患有细菌血症或真菌血症仍取决于临床情况和致病微生物的种类。幸运的是，采用含某些添加剂的血培养瓶时，总采血量可减少到一半，即 40 ml，如本章后面所讨论。也就是说，即使对于关注化验总采血量的贫血患者或其他病因患者，减少每次培养的采血量也是没有益处的，这样做只会降低病原菌的分离效率。一种较好的备选诊断方案是改变血培养取血次数(如后文所述)，并根据患者医疗所必需的化验项目限定总采血量。

现有的数据表明儿童与成人一样，血液培养的阳性率随培养的血量的增加而增加[17]。对于大龄儿童，血培养的取血量应该与规定的成人采血量区别很小或完全没有区别。虽然没有临床对照试验提供指南，但一般来说，12 岁及以上儿童(除了那些身材比同龄人小巧的孩子)采血量应该依据成人标准。相反，对于新生儿、婴儿及小儿，这些患者的总血量小，加上实际采血困难等因素，限制了总采血量。有几个关于血培养安全采血量的建议，但这些建议并没有达成广泛共识(表 4-1)[17]。此外，对于贫血患者，可能需要进一步减少血培养的采血量[12]。由于一次抽取的血培养的数量对于正确解释血液培养结果至关重要，因此只要条件允许，儿科患者也应尽可能抽取不少于 2 瓶的血培养，尽管通常不可能对新生儿这样做。虽然儿科血培养瓶的设计是为了适应较低的血容

表 4-1 儿科患者血培养采血量建议[a]

来源	患者体重(kg)	%TBV
Cumitech 1C[b] 和 IDSA/ASM[c]	≤1～2	4
	2.1～12.7	3
	12.8～36.3	2.5
	>36.3	1.8～2.7
CLSI[d]	不超过 1% of TBV	

注：[a]ASM. 美国微生物学会；IDSA. 美国感染病学会；TBV. 血培养总采血量；不包括可同时抽取用于其他实验室检测的血量。[b] 数据源自参考文献[111]。[c] 数据源自参考文献献[112]。[d] 数据源自参考文献[12]

量，但几乎没有证据表明它们比常规血培养瓶有任何明显的优势[17]。由于儿科患者专性需氧菌引起的血流感染风险高，而厌氧细菌引起的血流感染风险低，当只能获得少量血液时，应全部在需氧瓶中培养[17]。

(二)血培养数量

采集适当数量的血培养瓶有 2 个优点：①确保有足够的血培养采血量；②让临床微生物实验室能正确地解释血培养结果。单次血培养的结果如果遇到污染菌[病原真菌如荚膜组织胞浆菌(*histoplasma capsulatum*)]将难以解释，除非分离到的是一种罕见的病原菌(笔者指的是如果真的分离到)。除上述的例子外，大多数分离株应该是从 2 套或以上血培养中分离出才考虑是细菌或真菌血症的原因。在一系列血培养中，污染菌通常只会出现一次阳性，而病原菌通常会出现多次培养阳性。对于存在血管内感染病灶(如感染性心内膜炎(infective endocarditis)的患者，一系列的血培养都应分离到同一病原菌。

大家共同关心的问题是血培养诊断的敏感性(sensitivity)和特异性(specificity)。由于细菌血症或真菌血症患者临床表现多种多样，临床体征和症状不能作为血培养可以参考的金标准。也没有任何其他的实验室方法(或组合方法)能作为可替代的金标准，包括最近发展起来的直接检测微生物核酸的检测方法。在没有金标准方法的情况下，只能对方法诊断的敏感性和特异性进行估算。有 4 篇研究直接阐述了这个问题[13,18-20]。这些研究是在 1975—2007 年的 32 年间进行，所以只能粗略比较他们的结果。这是因为：①研究使用了不同的血培养系统；②血培养采集量不同；③在此段时间病原菌的分布也有所变化；④使用的抗菌药的种类也明显不同；⑤在这段时期正是大量静脉装置、移植物和假肢置入和广泛使用期间；⑥所有的研究设计都是不同的。这 4 项研究的结果总结见表 4-2。

表 4-2 血培养数量与检出病原菌的累计百分数关系

培养数量	下列研究中病原菌检出累计百分比(%)			
	Washington[a]	Weinstein 等[b]	Cockerill 等[c]	Lee 等[d]
1	80	91.5	67.4	73.1
2	88	>99.0	81.8	85.7
3	99		95.7	98.2
4			100.0	99.8

注：[a] 源自参考文献[13]。在表中的 4 组中，这是唯一不包含感染性心内膜炎的研究。[b] 数据源自参考文献[3]。[c] 数据源自参考文献[13]。[d] 数据源自参考文献[20]

问题在于，传统推荐的抽取 2 或 3 次血培养用于普通病原细菌和真菌的培养仍会产生可接受的敏感性和特异性。显然，1 份血培养是不够的。因为 2 份血培养也只能检出 80%～90% 的病原菌，所以，需要送检至少 3 份血培养，这样可以检出 96%～98%的病原菌。尽管 4 份血培养能覆盖将近 100%的病原菌，但是常规抽取 4 份血培养有以下几个弊端：①不是所有患者都需要；②如果对所有患者实施会大幅度增加费用；③对有些患者不现实。曾推荐过一种方法是在首个 24 h 内送检 2 份血培养，在随后的 24 h 内再送检 2 份血培养[13]。此方法的主要缺点是菌血症的检出会再延迟 24 h，且几乎没有证据表明它可以提高检测敏感性。还可以采取这样的方法：对于阳性概率高

的患者(如感染性心内膜炎患者)每次血培养的瓶数宜多[3-4],而阳性概率低的患者瓶数则减少[2-3],这样既符合贝叶斯(Bayesian)模型又适用于临床[21-22]。

尽管成年患者在身高和体重上有所差异,但一般来讲对于以前健康的成人患者,不需要依据身高或体重来调整血培养采集数量。对于贫血患者,因抽血或实验室检测会加重贫血,因而决策是取决于血培养(或其他实验室检测)是否非常必要。如果临床表现需要做血培养时,减少血培养数量或采血量不仅不符合临床和实验室要求,对患者也很不利。

(三)血液的稀释

稀释血液问题在用旧式血培养基时很重要,因为血液自身有抗菌作用,并且血液中含有抗菌药物,两者均需要较多体积的液体培养基稀释。后来明确,现代血培养系统采用标准化的培养基,其中含抗凝剂和其他因子,血液/培养液的比例保持在(1∶5)~(1∶10)就已足够(如后文所述)。培养基中再加入添加剂,它们可以结合或隔离抗菌药物,血液/培养液的比例可能只要1∶4即可。

(四)抗凝剂

以前因为血液凝固会降低阳性率[23],血培养瓶中先后加入过几种不同的抗凝剂。基于对血培养中抗凝剂对细菌抑制作用的研究,几乎所有抗凝剂均已被淘汰。如今大部分商业化血培养瓶都含低浓度的聚茴香脑磺酸钠(sodium polyanethol sulfonate,SPS),一些培养瓶只含有枸橼酸钠或同时含有SPS。SPS除具有抗凝作用外,还能抑制补体活性、灭活临床剂量的某些氨基糖苷类抗生素、灭活溶菌酶、并阻断吞噬作用。这4种特性对从血培养中分离病原微生物的影响未知;然而,临床对照试验已证实,适当浓度的SPS有助于革兰阴性菌和链球菌的检出。目前已知SPS可抑制某些细菌的生长,包括阴道加德纳菌(*Gardnerella vaginalis*)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、念珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*)和厌氧消化链球菌(*Peptostreptococcus anaerobius*)[24]。

(五)摇动

现已证实,无论哪种机器,摇动需氧血培养瓶能增加病原菌的检出,而且所有自动化仪器都有摇动需氧瓶的设置,大多数厌氧瓶也可摇动。

(六)培养基和添加剂

虽然在同一期间曾经有很多种肉汤培养基用于血培养,但目前大多数商品血培养瓶都使用大豆酪蛋白消化物肉汤,又名为胰蛋白酶大豆肉汤。与大豆酪蛋白消化物肉汤相比,其他类型的培养基并无优势,即使是那些用于分离特殊病原体的培养液。

过去,培养液中加入过很多种添加剂,其中很多已不再应用。目前的培养基添加剂,是为正在接受抗菌治疗的患者提高病原菌的分离而设计的,这显然是有益的,其优点是允许使用较低的血或肉汤比,且不会伴有微生物分离效率的下降。某些添加剂的使用也可能增加污染菌的分离率[12,16]。

五、标本采集

(一)皮肤消毒

对不同皮肤消毒剂的评估已报道了半个世纪,随着时间推移,人们对哪种消毒剂效果好已有了正确的结论。然而,不能过分强调消毒剂效果,消毒剂之间的差异很小,而且目前更重要的是皮肤消毒技术[25]。一般认为,最好的消毒剂是氯己定,其次是碘酊、碘伏,然后是各种乙醇溶液。每种产品都提供了特定的消毒程序,因此,这里就不再赘述,但使用者应严格遵循。对于2个月以下的婴儿,不应使用氯己定,而应使用乙醇棉签。或许最应该强调的一点是,皮肤消毒需要时间:按消毒程序操作的时间及消毒剂起效的足够时间。如下文所述,消毒是否有效,可通过监测污染率显而易见。

对于成人和大龄儿童,应从肘前窝静脉抽血。不仅因为这个部位的静脉容易穿刺,而且因为此处管腔足够大,易于穿刺针和注射器进入(也就是说,不需要"蝶形"针),且静脉不容易被扎穿。尽管从静脉抽血很普通,但血培养最好不要从血管内留置管抽血,否则会导致较高的污染率。对于

疑为导管相关感染的患者，既可以从导管内抽血，也可以从静脉穿刺点采血做培养，并将结果进行比较[12,26]，见下文所述。

(二)数量和培养时间

如上所述，应依次从不同的静脉穿刺部位抽取3～4瓶血培养来检测细菌血症或真菌血症。单独一瓶血培养的敏感性不足以检测出菌血症，并且很多分离株的结果无法解释[如凝固酶阴性葡萄球菌(coagulasenegative *Staphylococci*)]。在抽取每份血培养之间相隔一些时间是无益的[27-28]，尽管这种做法已经广泛使用了数十年。

对于疑似感染性心内膜炎或具有其他血管内感染灶的患者来说，以下3个微生物学因素具有重要意义，即证实菌血症、确定感染病原菌和描述抗菌药物敏感谱。虽然在一些指南中提倡间隔血培养，以记录与心内膜炎相关的菌血症的持续性，但没有数据支持这种做法。相反，如上所述，重点应该是足够数量的套数(量)，同时获得并迅速处理，以实现最佳的临床应用性。对于有人工心脏瓣膜或其他植入器械的患者，可能是由凝固酶阴性葡萄球菌(coagulasenegative *Staphylococci*)引起的感染，通过皮肤消毒使污染风险最小化是至关重要的。另一个要点是，不要从这类患者的血管内置管中抽取血培养。感染性心内膜炎患者的感染通常是由普通细菌性病原菌引起的，因此，血培养不需要使用特殊培养基或延长孵育和监测时间。在常规血培养中会出现乏养菌属(*abiotrophia*)或颗粒链菌属(*granulicatella*)菌种，但如果血培养肉汤未经过传代在巧克力琼脂上培养，后续鉴定将被延迟或错过[12]。孵育时间无须超过5天，因有2项研究报道过所有分离自感染性心内膜炎患者的病原菌会在5天内生长[13,29]。在疑似培养阴性的心内膜炎病例中，如巴尔通体属(*Bartonella*)引起的心内膜炎，延长培养时间可能有用，但应考虑用于其他诊断检测，如核酸扩增或血清学检查。

六、血培养结果的解释

与那些直接报告阴性或阳性2种结果的实验室检测不同，血培养会产生一系列复杂的结果，只能结合采集时的临床情况进行解释。由血培养产生的信息包括：从标本(或混合微生物)中分离出的任何细菌或真菌的鉴定、阳性或阴性培养的数量、检测到微生物生长的时间。所有这些信息的解释还必须借助以下内容：①细菌血症或真菌血症的验前概率；②其他临床、实验室或放射影像的发现；③从身体其他部位分离的病原菌；④治疗有效(或无效)，临床症状和体征；⑤主管医生的临床判断。

在日常的临床实践中，血培养解释不能只依赖于分离微生物的鉴定。一些分离菌向来不是污染菌[例如，布鲁菌属(*Brucella* spp.)菌种、土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)及荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)]，而且易于解释，但大多数分离的细菌或真菌需要进一步的解释。例如，金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)中的其他种属，铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和白念珠菌(*Candida albican*)，它们通常是致病菌，但是在少数情况下可以是污染菌[3]。相反，许多其他菌种[例如，丙酸菌属(*Cutibacterium*)、非炭疽芽胞杆菌的芽胞杆菌属(*Bacillus* spp)和多数棒状杆菌属(*Corynebacterium*)]几乎全为污染菌群。确定凝固酶阴性葡萄球菌的临床重要性(如果存在)通常很难，因为这类菌本身的鉴定几乎或完全无用。对于留置导管、有移植物或假肢的患者尤其如此，从这些患者分离到的凝固酶阴性葡萄球菌是常见的感染病因之一。另一个很好的例子是路邓葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)，它类似于金黄色葡萄球菌可引起外来装置或宿主组织的感染，但它也可能是污染菌[30]。从血培养分离的这种细菌，与其他凝固酶阴性葡萄球菌一样，需要其他信息进行正确的临床解释。即使是分离自单瓶血培养，也可能有重要临床意义。

与经留置静脉导管内采集的血培养相比，经静脉穿刺抽取血培养的解释更为直接明了。对于从留置管中采集的血培养，结果解释还需分析其他因素，包括置管的类型，置管的部位，置入的时间，分离菌只是从置管内或静脉穿刺血培养获得，还是两者都有。现已提出许多解释标准，但是各家研究的方法不同，难于解释和比较。虽然无法避免有些复杂，但目前仍然使用CLSI标准[12]，如表4-3所示。

表 4-3 CLABSI 的解释标准[a,b]

短期外周[c]置管
方法
经静脉穿刺抽取 2 套外周血培养
无菌操作拔出外周导管并使用 Maki 半定量方法培养
解释
如果 1 套或多套外周血培养阳性，并且导管半定量培养为阳性(≥15 个菌落)，并且血培养和导管培养为同一种微生物：提示为 CLABSI
如果 1 套或多套血培养阳性，但导管半定量培养为阴性：不能下结论(除外金黄色葡萄球菌或念珠菌属)
如果血培养为阴性，但导管培养为阳性(任意菌落数)：提示为导管定植菌
如果 2 套血培养为阴性，并且导管半定量培养也为阴性：不会是 CLABSI
非隧道式及隧道式中心静脉导管和 VAP[d]
方法
2 套外周血培养中至少 1 套为静脉穿刺抽血；另 1 套血培养应在无菌操作下从导管接口处或经 VAP 膜抽取
解释
如果 2 套血培养均为阳性，且为同一种微生物：提示为 CLABSI
如果 2 套血培养均为阳性，且为同一种微生物，并且导管血培养报阳时间早于外周静脉血≥120 min：提示为 CLABSI
如果 2 套血培养均为阳性，且为同一种微生物，并且导管血培养报阳时间早于外周静脉血，≤120 min：且抗菌药物敏感性表型一致，仍可能为 CLABSI
如果 2 套血培养均为阳性，并且其中导管血培养的菌落计数至少为外周静脉血培养的 5 倍(适用于采用手工定量计数法的实验室，如溶菌-离心法)：提示可能为 CLABSI
如果仅导管血培养阳性：不能确定为 CLABSI，提示可能为定植菌或采集血标本时的污染菌
如果仅外周静脉血培养阳性：不能确定为 CLABSI；但除外分离到金黄色葡萄球菌或念珠菌属；如果是这种情况，导管尖端或其他导管/外周血培养分离出同一种微生物，可确定为 CLABSI
替代方法
静脉穿刺抽取 2 套外周血培养
无菌操作拔除导管并使用 Maki 半定量方法进行培养
解释
如果 1 套或 2 套血培养阳性，且导管培养与血培养为同一种微生物：可能为 CLABSI
如果 1 套或 2 套血培养阳性，虽导管培养为阴性，但如分离到金黄色葡萄球菌或念珠菌属，可能为 CLABSI；这种情况时，必须再额外做 1 套外周血培养，结果为阳性且为同一种微生物，就可确定为 CLABSI
如果外周血培养阴性，但导管培养为阳性，考虑定植
如果外周血培养和导管培养均为阴性，则不可能为 CLABSI

注：[a] 适用于所有分类，且没有任何其他明确感染源；CLABSI. 导管相关性血流感染。[b] 修改自参考文献[12]的内容。[c] 表中"外周的"一词特指经由外周静脉穿刺获得的静脉血标本。[d] VAP. 静脉导管的接入口

为了血培养结果解释得更加准确可靠，现已推荐了另一标准。有几个自动化仪装置研究了"报阳时间"，即自动化血培养系统在培养瓶阳性时报警(即检测到一个生长信号)的时间，或称作"报阳时间"。尽管致病菌相比于污染菌会较早地被检出，即这 2 类菌与报阳时间有一定的相关性，但由于 2 类菌的报阳时间重叠得太多，以至于这个理论甚少在临床应用。此外，报阳时间显然不适用于生长缓慢的微生物，也不大可能用于正在接受抗生素治疗的患者，因为微生物生长的检出会出现延迟。不像使用报阳时间来区分污染菌与致病菌，使用报阳时间来预测临床结果，现在有很好的数据支持[31-36]。这个理论有一个例外，即孵育超过 72 h 后的分离菌株中，大部分可认为是污染菌，显然生长缓慢的致病性细菌和酵母菌要除外[37]。

另一个常用的规则是要考虑阳性瓶的数量，而不是阳性培养物的数量。虽然很多研究对此有争议，Mirrett 等[38]的一项研究表明，对于凝固酶阴性葡萄球菌，多套血培养中的阳性瓶数量和分离菌的临床重要性之间没有相关性。这一观察结果适用于送检 2、3、4 套血培养的情况[38]。对于血培养其他的分离菌，很少有资料报道，但由于血培养微生物呈泊松分布，没有理由认为凝固酶阴性葡萄球菌的研究结果不适用于其他种类的分离菌。

最后一点，有时仍然出现定量血培养的问题。虽然制定过定量(或半定量)方法，而且有一些数

据支持这种方法,但实际上并不适用于常规开展。此外,随着具有更高分析敏感性的新技术的发展,有可能会设计出可代替的标志物,来定量计数血培养中的病原菌。

七、实验室检测——基于培养的方法

传统检测细菌血症或真菌血症,系通过直接培养血液标本分离病原微生物,或间接地鉴定可代替的标志物而得。后者在20世纪70~80年代被广泛研究,尝试过的方法有:鲎内毒素试验(limulus endotoxin assays)或血中细菌抗原检测,但是这些努力大多只有历史价值。因此,血培养仍然是唯一被保留和广泛应用于细菌血症和真菌血症检测的实验室方法。

血培养在一个世纪前首次被提出,在20世纪30年代已有大量的研究涌现,其中的一些方法至今仍被沿用。到20世纪60年代,血培养已广泛应用,但方法差别很大,许多方法都在使用中(各有所长),随着时间的推移,逐渐发现所有的方法都有待改进。在20世纪70年代,John Washington[18]和其他研究人员开展了一系列实验和临床对照研究,以明确细菌血症和真菌血症检测的关键因素,确立血培养的最佳方法,建立科学证据,这一切为今后血培养系统的发展和广泛应用奠定了基础。在这些研究之外,还不断涌现了许多关于血液中分离致病微生物关键因素的认知,从而促使临床更加认真对待血培养,厂商将这些关键因素融入商品的设计和使用中,促进了商品化血培养系统的不断发展。

(一)手工血培养系统

美国仍有相对很少的非自动血培养系统在生产和销售。在售的这些仪器具有鲜明的诊断优势和局限性特征。这些系统适于检测常见细菌和真菌病原体,易于使用,只需要一个无CO_2的普通孵箱,而且价格低廉[16]。手工系统的主要缺点是劳动强度大,这妨碍了它们在实验室全程处理化中使用,即便是处理中等标本量血培养标本也麻烦,结果周转时间也较慢,并且无法通过现代实验室信息系统连接结果报告和提供数据管理。此外,随着小型血培养仪器的问世,小样本量血培养的实验室也可以选用自动化系统了。美国市场上仅存3种人工血液培养系统:Septi-Chek (BD Biosciences, Sparks, MD)、Oxoid (Remel, Lenexa, KS)和 Isolator (Wampole Laboratories, Cranbury, NJ)裂解-离心系统。

Septi-Chek是双相培养系统的新品牌,这个双相系统最初是Castaneda从血液中分离布鲁菌属时开发。之所以称之为双相,是因为系统中包含传统的液相普通肉汤培养基和由不同琼脂培养基组成的固相培养基。在双相系统中,将血液接种到培养瓶内,与普通肉汤培养基混合。通过其中的一个设置,就像直接转种一样,血液-肉汤混合物被倒流到固体培养基之上。Septi-Chek双相系统新产品包含一个塑料片,实验室收到血培养瓶后,将琼脂-塑料片装置固定到在瓶口上。当然,这是一个需氧系统,为查厌氧菌,另外有一类无琼脂片的瓶子。之后瓶子置温箱培养(伴或不伴摇振),每天肉眼检查培养瓶1次或2次,判断是否有微生物生长。琼脂包被的塑料片有2种功能:一是提供了检测微生物生长的第二种手段,二是用于早期分离微生物菌落。每次观察后,颠倒需氧瓶,使血液-肉汤混合物再转种琼脂片1次。

目前市售Septi-Chek血培养瓶有多种,每种瓶含一种不同的肉汤培养基,都加入了0.05% SPS作为抗凝剂。有2种容量可供选择:70 ml肉汤瓶适用于最多10 ml的血液样本(以保持适当的血液/肉汤比例);20 ml肉汤瓶适用于不超过3 ml的血液样本。血培养瓶培养基有几种,各含有:大豆酪蛋白消化肉汤(soybean-casein digest broth)、大豆酪蛋白消化/哥伦比亚肉汤(soybean-casein digest/Columbia broth)、大豆酪蛋白消化/巯基乙酸盐肉汤(soybean-casein digest/thioglycolate broth)及脑心浸出液肉汤(brain heart infusion broth)。琼脂塑料片采用巧克力、麦康凯(MacConkey)和麦芽汁琼脂3种。

受控的临床评估证明Septi-Chek表现良好,是常规工作中可接受的手工操作系统[39-43]。尽管没有将Septi-Chek与当前的自动化系统进行任何比较,但与非辐射测量的Bactec Plus 26需氧瓶进行的比较表明,Septi-Chek在微生物产量和检测时间方面都较差[140]。因此,由于目前的自动血液培养瓶的性能至少与非辐射性的Bactec

瓶一样好，Septi-Chek 可能不如目前的自动血液培养系统。

与 Septi-Chek 系统相比，Oxoid Signal 手工血培养系统是一个单瓶系统，没有厌氧培养品种。Oxoid 是 Castaneda 瓶的另一种改良瓶。Oxoid Signal 中，血液通过瓶盖上的橡胶隔膜注入瓶内，Signal 装置包含一个空的塑料圆柱体连接一个针头，在插入瓶子时，这个装置延伸到血液-肉汤混合物层的下面。在微生物生长时，释放出气体进入血液-肉汤混合物，且浓度不断增加，与瓶内顶端的气体达到平衡。随着时间的增加，瓶内大气压增加，最终使一些血液-肉汤混合物通过针头向上进入相连的 Signal 设备。虽然该系统提供了检测微生物生长的第 2 种机制，但并不像 Septi-Chek 一样能在早期就分离出微生物菌落。在受控的临床评估中，Oxoid Signal 系统的性能不及其他血培养系统[44-47]。

溶菌-离心系统是将血液样本接种到混有溶菌剂-皂素、抗凝剂和氟碳化合物缓冲剂的管中。之后血液被皂素(saponin)裂解，混合物离心分层。然后将上清液清除并丢弃，将含悬浮颗粒的液体接种到你认为能分离出特定病原体的培养基中。但因有报道称延迟处理会减少一些菌的分离，如厌氧菌，某些嗜血杆菌菌种和肺炎链球菌(皂苷还会导致肺炎球菌溶解)，所以，在常规使用中以肉汤为基本成分的其他商品系统会更好[48-53]。虽然 Isolator 曾是分离致病性酵母菌、双相型真菌(dimorphic fungi)、分枝杆菌(*Mycobacteria*)和巴尔通体属菌种的好方法，但对于这些病原体的分离，其他系统(见下文)至少和 Isolator 的表现相当。检测巴尔通体属菌种的最佳方法是核酸扩增；如果没有这种方法，也可以采用血清学试验。以上这些问题，以及溶菌-离心法的手动性质，使得其很少在常规工作中开展。

(二)自动化血培养系统

在 20 世纪 60～70 年代，血培养标本量开始增加，因而需要劳动力密集度低一些的方法，人们逐渐增长了开发自动化血培养系统的兴趣。因此开发和试验了一些自动化仪，但只有几个在市场上取得成功。其中第一系统是 Bactec 460 放射性测量系统(Becton Dickinson，Sparks，MD)，它是由 Bactec 220 系统衍生而来，Bactec 220 系统于 20 世纪 60 年代末研制成功，在 20 世纪 70 年代初首次进入市场。在之后的 20 多年间，Bactec 660、730 和 860 系统依次成功地替代了 460 系统。这些系统的相同之处是通过监测微生物产生的 CO_2 来检测其生长。Bactec 220 和 460 系统采用放射性测量法检测[14] C 标记的 CO_2，而 Bactec 660、730 和 860 系统采用红外分光光度法检测 CO_2 的产生。由于放射性和非放射性检测方法，都是要求吸出瓶顶一部分气体，每日超过 1 次或 2 次监测是不可能的。这是因为每个瓶子在采集样本后都必须向每个瓶子中加入等体积的无菌气体来保持合适的压力。这样每次会造成气体中 CO_2 含量的轻度下降，进而限制采样频率。由于每日仅 1 次或 2 次采样，不能在尽可能早的时间内检测出微生物的生长，所以需要新一代的血培养技术。

下一代自动化血培养系统系连续监测血培养系统(continuous-monitoring blood culture systems，CMBCS)，该系统在 20 世纪 80 年代末设计，在 20 世纪 90 年代问世。不同于每天只监测几次瓶内 CO_2 产量的上一代自动系统，新系统对 CO_2 产量的监测极为频繁，通常每 10～15 min 测 1 次[16]，这套系统的命名由此而来。当旧的自动系统瓶内的 CO_2 水平超过特定的阈值水平，它就会提示可能有微生物生长。而不同于旧检测系统，CMBCS 应用几套计算机演算程序中的一套来演算检测微生物的生长：一是阈值水平，二是 CO_2 产量的线性持续增长，三是 CO_2 产生速率的增长(虽然每个厂商使用的特定计算机演算法是有专利的)。由于后 2 个标准取决于生长中微生物的活性，所以对于接种后延迟放入系统的瓶子，如果放入之前已经有过微生物生长，并已产生过 CO_2，就会导致瓶内的微生物被延迟检测或不能被检测到。由于每个瓶子都有如此大量的数据需要被分析，并且由于每一个孵育箱内有许多瓶子，所以，与其他别的原因相比，CMBCS 的成功之处主要在于它安装了更加强大的计算机处理器和内存，因而不再需要其他任何东西。

由于 CMBCS 要频繁检测 CO_2 水平，还需解决其他 2 个检测障碍。第一是要免去采样和不要向瓶子顶部空间补充气体。随着传感器的发展这一点已实现，它可以透过瓶壁读取而无须进行侵入性检测。第二是要取消反复手工装瓶，并将

瓶子放入用于检测的设备上。虽然 Bactec 860 系统在一定程度上实现了这个功能，但还是需要将每个瓶子移到测试设备上。相反，CMBCS 采用了单独监测每个瓶子传感器的装置，因而无须在培养和检测设备之间移动瓶子。总之，与 Bactec 放射和非放射性系统相比，CMBCS 更为频繁的测试将微生物生长的检出时间缩短了 1.0～1.5 天[16]。

广泛来讲，这些特点适用于 CMBCS 系统所有类别的培养瓶；添加吸附剂的瓶子培养效果更好；只需要 4～5 天的培养和检测时间，无须混匀和(或)最终再培养，且添加吸附剂的瓶子会增加污染微生物菌群的检出。

(三)BacT/Alert 血培养仪

第一个 CMBCS 系统是 BacT/Alert 血培养仪，于 1988 年开发出有待完善的原型机，并在 1990 年进行了有限的临床试验[54]。BacT/ Alert 是一套比色系统，通过瓶底 pH 敏感装置的颜色变化来检测瓶内 CO_2 浓度的变化。自问世以来，该系统在类型和配置上经历了一系列的改进，BacT/ Alert 3D 和 VIRTUO 是当前最新型号的仪器。较新的系统较 3D 系统检测时间更短[55-56]。培养基系列配方包括标准化需氧和厌氧基质；包括需氧的、厌氧的和儿童(只有需氧)苛养的；抗生素中和培养基(fastidious antimicrobial neutralization，FAN)[内含活性炭和硅藻土(Ecosorb)用来灭活和吸附抗生素]方面：FAN 需氧瓶(FAN aerobic，FA)、FAN 厌氧瓶(FAN anaerobic，FN)和儿童 FAN 瓶(pediatric FAN，PF)；树脂 FA、树脂 FN 和树脂 PF 培养基(其中包含有专利权吸附剂聚合珠)；还有专用于检出分枝杆菌的分枝杆菌(MP)瓶。自 20 年前引进 BacT/Alert 以来，已经发表了许多关于 BacT/Alert 的临床评价，描述了该系统和已出品的各种瓶型的性能特点(表 4-4)。

表 4-4 BacT/Alert 血培养系统性能特点总结

用于检出常见病原性细菌和酵母菌，BacT/Alert 标准瓶与其他不含添加剂的商品化血培养瓶效果相同[54,113-114]
用于检出常见病原性细菌和酵母菌，BacT/Alert 需氧 FAN 瓶优于标准需氧瓶[115]
用于检出常见病原性细菌和酵母菌，除外严格需氧菌(如革兰阴性非发酵菌和酵母菌)，BacT/Alert 厌氧 FAN 瓶优于 BacT/Alert 标准厌氧瓶[116]
在早期检测期检出常见病原性细菌和酵母菌，BacT/Alert FA 树脂和 FN 树脂瓶优于 FA 和 FN 瓶[117]
在早期检测期检出常见病原性微生物，BacT/Alert PF 树脂瓶优于 PF 瓶[118]
对于 FA 树脂瓶，早期检出常见病原性细菌和酵母菌，BacT/Alert FA 树脂和 FN 树脂瓶优于 BacT/Alert 标准瓶，且 FA 树脂瓶会更早检测到病原菌[117,119]
用于检出常见病原性细菌和酵母菌，BacT/Alert FAN 瓶与其他含添加剂商品化血培养瓶效果相同[120-121]
用于提高正在接受抗生素治疗患者开展培养的检出率，BacT/ Alert FAN 瓶和其他商品化血培养瓶效果相同
对于检测细菌和真菌血症的发生，BacT/Alert FAN 瓶优于 BacT/Alert 标准瓶[115-116,122]
BacT/Alert FAN 瓶比 BacT/Alert 标准瓶更易检出污染性细菌
BacT/Alert 培养瓶采用 5 天替代 7 天孵育期，其病原性细菌和真菌检出率无明显减少[123-124]
对于血培养仪报告阴性的瓶子采用终点再培养，并不会增加病原性细菌或酵母菌的检出
BacT/Alert 标准需氧瓶，接种 10 ml 血液比接种 5 ml 血液能检出更多微生物[125]
对于微生物检出率，BacT/Alert 塑料血培养瓶与玻璃瓶培养效果相同于玻璃瓶，且能减少破碎风险[126-129]
BacT/Alert VIRTUO 系统比 3D 系统的检测微生物生长所需时间更短；同时也能评估瓶子的体积和自动卸载瓶子[55-56]

(四)Bactec 9000 Series

1992 年 Becton Dickinson 公司引进了第 2 个 CMBCS，也就是 Bactec 9000 系列。最初有 2 个型号，Bactec 9120(每箱体装 120 个瓶)和 Bactec 9240(每箱体内装 240 个瓶)。几年后，为满足实验室对小容量自动化系统的需求，Bactec 9050(可装 50 瓶)上市[57]。Bactec 技术与 BacT/ Alert 相似，主要的区别在于 Bactec CMBCS 使用荧光-传感机制来检测 CO_2 的产生。

Bactec 系统使用几种培养基配方：包括标准需氧/F 瓶和标准厌氧/F 瓶，树脂需氧瓶和树脂厌氧瓶(瓶内含有附着在小玻璃珠上的抗生素吸附树脂)，含溶血素/10 厌氧/F 瓶，树脂儿童/F 瓶，以及用于提高真菌和分枝杆菌检出率的含溶血素 Myco/F 瓶。每种瓶子都可以接种多达 10 ml 的

血液标本，儿童树脂/F 培养瓶例外，它只能接种 1～3 ml 血液。大量关于 Bactec 标准和树脂/F 培养瓶在 Bactec 9050、9120 和 9240 系统上应用的临床评价已陆续发表。表 4-5 为这些系统性能特点的总结。

表 4-5 Bactec 血培养系统性能特点总结

用于检出常见病原性细菌和酵母菌，Bactec 标准瓶与其他不含添加剂商品化血培养瓶效果相同[79]
用于检出常见病原性细菌和酵母菌，Bactec 树脂/F 瓶优于 BacT/ Alert 标准瓶[80]
用于检出常见病原性细菌和酵母菌，Bactec 树脂/F 厌氧瓶优于 Bactec 标准厌氧瓶[80]
用于检出常见病原性细菌和酵母菌，Bactec 树脂/F 瓶与其他含添加剂的商品化培养瓶效果相同[74,81]
用于检出正在接受抗菌药物治疗患者选择血培养中的病原体，Bactec 树脂/F 培养瓶与其他含添加剂商品化培养瓶效果相同
为了查出细菌和真菌血症的发生，Bactec 树脂/F 瓶优于无添加剂的培养瓶[80]
Bactec 树脂/F 培养瓶比 Bactec 标准培养瓶分离到更多的污染性细菌

与标准/F 和树脂/F 培养瓶相比，Bactec 含溶血素 Myco/F 瓶可用来检出分枝杆菌、真菌及常见的细菌病原体。含溶血素 Myco/F 瓶不同于所有其他的 Bactec 9000 培养瓶，该瓶子中的荧光传感器检测的是下降的氧气浓度（即检测耗氧量），而不是检测增加的二氧化碳浓度。大量临床试验表明，含溶血素 Myco/F 瓶检测分枝杆菌和真菌相比于其他系统更好。一项早期的研究报道，与 Isolator 系统相比，含溶血素 Myco/F 瓶很少检出荚膜组织胞浆菌分离株，但能检出更多的新生隐球菌分离株（*Cryptococcus neoformans*）[58]。含溶血素 Myco/F 瓶与 ESP Ⅱ 瓶在检出分枝杆菌时，显现出的效果大体相同，但对于鸟分枝杆菌复合群（*Mycobacterium avium complex*）的分离，含溶血素 Myco/F 瓶表现得好得多[58]。最近很多研究表明，含溶血素 Myco/F 瓶和 BacT/Alert MB 瓶对结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）和鸟分枝杆菌复合群临床分离株的培养效果一样，但比 Isolator 10 系统明显更快些[59-60]。

（五）VersaTREK 血培养系统

在 20 世纪 90 年代间引进了第 3 个 CMBCS 系统——ESP 系统（Difco Laboratories），也就是目前由 Thermo Scientific(Cleveland，OH)销售的 VersaTREK。VersaTREK 在以下方面与 BacT/Alert 与 Bactec 系统存在重大的差异：① VersaTREK 采用不同的系统来检测微生物的生长。一旦血培养瓶被实验室接收后，在装入仪器前先给瓶子安装一个适配器装置。探测器可使系统监测到每个瓶内顶端的气压变化，包括微生物生长消耗或产生的氧气、氢气、氮气及二氧化碳。②在每一个需氧瓶内配有一个搅拌棒，用以充分混匀血液和肉汤混合物，而厌氧瓶内不用搅拌。③在 VersaTREK Redox 1 需氧瓶内的液体培养基是大豆酪蛋白胨肉汤，而 Redox 2 厌氧瓶中的液体培养基是蛋白-蛋白胨肉汤。④对瓶内微生物生长的监测并不很频繁：需氧瓶每 12 分钟检测 1 次，厌氧瓶每 24 分钟检测 1 次。⑤ BacT/Alert FAN 和 Bactec 树脂瓶内都含有添加剂来减低或消除血标本中抗生素活性，而 VersaTREK 培养瓶不同，Redox 1 和 Redox 2 瓶内含有 80 ml 培养液，较大的体积使血液标本和其中含有的任何抗生素都被稀释得更多。在售的可将血液标本直接采集到瓶内的 Redox 1 EZ Draw 和 Redox 2 EZ Draw 培养瓶较小，但内仍含 40 ml 培养液，与 BacT/Alert 和 Bactec 培养瓶相比，仍会将血液标本稀释得更多。已发表了许多关于 VersaTREK 临床评价的研究，基于这些评估结果，表 4-6 为该系统的性能特点总结。

（六）儿童血培养瓶

大量的用于儿童患者的血培养瓶已经开发上市。由于对大量住院儿童开展临床试验有实际困难，因而对这些产品的评估没有做到像对成人患者产品评估的程度。使用这些瓶子没有什么缺点（除了成本有差异），在广泛接种肺炎联合疫苗和 B 型流感嗜血杆菌疫苗的地区也没有显现出儿童瓶的优势[17]。

表 4-6 VersaTREK 血培养系统性能特点总结

用于常见致病性细菌和酵母菌的检出，VersaTREK 瓶优于 Bactec 标准瓶
有些研究表明对于金黄色葡萄球菌的检出，VersaTREK 瓶不如其他系统中含有添加剂的血培养瓶[49,120,133-134]，但有一项研究得出相反的结论[135]
几项研究报道，VersaTREK 瓶能减少对污染菌的检出[15]，另一项研究得出相反的结论[136]
几项研究报道，VersaTREK 瓶能增加对链球菌和肠球菌的检出率[133-134,137]，另一项研究得出相反的结论[135]
一些研究中报道，对于从正在接受抗生素治疗患者采集的血培养，VersaTREK 瓶能明显检出更多的病原菌[133-134,137]
VersaTREK 培养瓶孵育时间选用 4～5 天而非 7 天，缩短培养时间没有明显减少病原性细菌和真菌的检出[138-139]

八、实验室检测——非培养方法

(一)用于败血症的可替代标志物

几种非微生物学试验在对细菌或真菌血症患者并相继出现脓毒症临床特征和体征患者的检测能力已得到评估。

早期的一些试验(其中如鲎试验)显示了检测败血症的潜力，但并没有被充分开发或推向市场。可能研究最为广泛的试验是降钙素原的测定。有证据表明，降钙素原的敏感性和特异性不足，不能用于细菌血症或真菌血症的检测。但对于已确诊为细菌血症或真菌血症的患者，降钙素原可用于连续监测并指导是否应停止抗生素治疗，区分一些细菌感染和病毒感染(例如，区分细菌性肺炎和病毒性肺炎)，为感染的严重性提供信息，还可指导选定患者的血培养的采集时间[61-62]。

(二)核酸扩增方法

许多实验室开发的试验用于从血液标本中直接检测细菌血症或真菌血症，这些试验已经被评估和报道[63]。正如本章其他部分所述，虽然实验室开发的试验可以起到概念验证的作用，但由于这些试验不能上市也不能传播到其他实验室，因此，很难在公众范围内大量应用。此外，开发和应用这些试验的费用昂贵得让人难以接受，而且超出许多实验室所能达到的专业水平。

SeptiFast(Rotkreuz，Switzerland)试剂盒目前已在部分欧盟地区上市，但没有在美国销售。该系统所设计的实时定量 PCR 方法，可直接从血液中检测 10 种革兰阴性杆菌、6 种革兰阳性球菌、5 种酵母菌和种丝状真菌。该方法采用 LightCycler 系统，虽然这种技术在美国已应用，但 SeptiFast 试剂盒不能在美国应用。

总之，对这一系统的临床评价毁誉参半[64]。总体来看，临床评价的数据显示应用 SeptiFast 检测血液中的病原菌敏感性相对较低。有几篇研究显示，该实验设计和定义相矛盾，还有其他因素使得数据难以解释，但总的来说，该方法作为独立试验缺乏足够的敏感性。研究认为，SeptiFast 可作为血培养的辅助项目，如果 SeptiFast 方法给出阳性结果，血培养会在之后的 3～7 天报阳，这预示着这类患者发展为复杂性血流感染的风险增加[65]。选用其他实验室方法能否得到同样的危险分层还有待评价。

另一个分子方法是 Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale，CA)，已用于从血标本中直接检测结核分枝杆菌。在一项小样本临床评估中，Xpert 试验测出的敏感性只有 21%(这一数据与上述 SeptiFast 试验结果非常相似)，但是在这组患者中，Xpert 试验阳性可以有效地区分哪些患者具有有早期死亡风险，哪些则没有[66]。

最近的另一个商品化试验是 T_2 磁共振试验(Biosystems, Inc.，Lexington, MA)，可直接从全血标本中检测念珠菌属。至今只有 2 项临床试验数据发表。在第一项研究中，大部分来自人为的血培养(常规查体患者采集血培养，其中一些标本加入 5 种念珠菌中的 1 种)，小部分来自预先采集的血培养[67]。虽然 2 种方法的敏感性和特异性都很高，但由于研究本身的局限性而缺少了最后的临床试验性能评估。在第二项研究中，小样本量的儿童患者参与了不同的实验方案，确诊的念珠菌血症患者进行第 2 次血培养抽取和检测，采用 T_2 系统进行检测[68]。与第一项研究相同，阳性标本(样本量为 15 例)没有进行最后的临床试验性能评估。

虽然分子试验在不断发展，如二代测序理论上可以直接从血标本中检测病原微生物(也可检测相关耐药基因)，并没有被临床作为常规充分应用。因此，目前没有分子方法可用于取代血培养。然而，如本章下节所述，这些试验广泛用于辅助血培养进行病原微生物的快速鉴定，并且可以提供

有限的特定药剂的抗性检测。

九、微生物分离株的快速鉴定

多年以来，人们已经引进了多种快速鉴定方法，也取得越来越多的成绩。初期主要尝试大量改进生化实验或早期分子生物学方法(如DNA探针)，但均未达到预期效果。最近的研究在选定的病原微生物菌群的快速鉴定方面取得了显著成效。此外，有证据显示血流感染病原菌的早期检测和鉴定，以及耐药性检测，有助于改善患者的预后[69]和促进抗生素的管理[70-71]。

(一)核酸肽-荧光原位杂交法

虽然核酸肽-荧光原位杂交(OpGen，Gaithersburg，MD)方法仅能鉴别几种病原菌，但它能有效地缩短鉴定血培养中病原菌所需的时间。这种方法的原理非常简单，就是基于广泛应用的原位杂交原理为基础。不像DNA和RNA探针有带负电荷的糖磷酸骨架结构，PNA的骨架结构是由带中性电荷的聚酰胺(肽)组成。这种中性电荷结构使得与靶核酸的杂交更加快速、紧密和特异。在荧光显微镜下可以观察到荧光染料标记的探针。一旦有血培养瓶报警为阳性，立即将血液-肉汤混合物制备成涂片，并进行革兰染色。基于革兰染色的结果，选择合适的PNA-FISH探针测试。在那些研究成果基础上，可以筛选出合适的PNA-FISH探针。对于金黄色葡萄球菌分离株，可选用检测mecA试验(mecA XpressFISH)作为辅助试验[72]。

这种方法易于操作，只是价格相对略高，除了临床微生物实验室已配备的基础设备外(荧光显微镜除外)，几乎不需要其他设备[73]。如果想让这种方法充分发挥优势，就必须对某个菌株特设专台进行检测，但这对于许多微生物实验室来说是不可行的。值得注意的是，一项PNA-FISH对于适当抗菌治疗时间的影响的研究显示，这项技术只适用于抗菌治疗项目[74]。

(二)实验室自主开发的核酸扩增试验

虽然实验室自主开发的核酸扩增试验技术似乎适用于这项应用，但由于此技术是很多用户开发的，其有效性有限；试验可能并不适用于其他实验室，开发和批准成本可能过高，且在一些国家管理机构会限制这类试验开发[63]。随着商品化试剂的出现，实验室更没有理由去自主开发这类试验。

(三)商品化多重PCR和微矩阵技术

成熟的商业体系有2种：Verigene assay (Luminex, Austin, TX)和Film Array (bioMérieux, Durham, NC)。美国FDA已批准这2个品牌在美国销售。FDA已批准Verigene可分别直接检测血培养中的革兰阳性或革兰阴性细菌，正在开发用于检测常见病原性酵母菌的试验。FilmArray产品，又称为血培养鉴定板，可同时在一块板上联合检测包括革兰阳性细菌、革兰阴性细菌和多种酵母菌在内的24种病原菌及3种抗菌药物耐药基因。2种产品都在美国广泛应用，并且在患者诊疗中发挥重要作用。一项近期的系统性回顾和meta分析显示，快速分子试验与抗菌药物管理项目相结合可明显降低死亡率，加速有效治疗和降低患者住院时长[75]。

Verigene是基于靶核酸PCR扩增的多通道分析系统，使扩增产物与包被在纳米颗粒上的寡核苷酸杂交后对其进行检测，随后应用制造商称作银染处理的放大信号来识别。FilmArray也是一种多通道分析系统，包括核酸提取纯化及之后的2个阶段PCR扩增。第1阶段是多重反应，之后再采用单一PCR扩增反应检测第1阶段的特定扩增产物，最后基于终点熔解曲线做出测定解释。

Verigene革兰阳性菌血培养试验已经在大量临床试验中进行评估。第1项是用VersaTREK血培养系统研究一批血培养。对获得的203例阳性血培养物进行了评估，其中微生物鉴定的一致率为94%，178株单一菌种的耐药性检测一致率为97%，在25个复合菌中鉴定和耐药性检测的一致率分别是92%和96%[76]。第2项研究血培养采用的是BacT/Alert系统。这项研究获得186例阳性血培养，176个单一菌种鉴定的结果显示，革兰阳性菌的总体一致率为96%，但是葡萄球菌的一致性仅为40%[77]，耐药性检测一致率为99%[63]。第3项研究148例血培养采用VerTREK系统，与传统鉴定方法的总一致率为95%；单一菌种鉴定一致率为99%，但一小部分复合菌的鉴定一致率仅为33%[78]。第4项研究是

一项小型临床试验，将 Verigene 革兰阳性血培养试验与 QuickFISH 和 MALDI-TOF MS（Bruker Daltonics，Billerica，MA）相比较[79]。该研究显示，Verigene 和其他 2 种试验在微生物培养方面具有高度一致性，但是 3 种方法都不能精确检测出复合菌中的所有菌株[79]。

在儿童医院的一项早期评估中，报道了与前三项研究相似的结果：试验显示 Verigene 在革兰阳性细菌的鉴定中具有 95.8% 的一致性[80]。Verigene 对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *S. aureus*）和耐万古霉素屎肠球菌（vancomycin-resistant *E. faecium*）的鉴定正确率为 100%，对耐甲氧西林表皮葡萄球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*）的鉴定正确率为 98%[80]。另外 2 家儿童医院的评估结果相似，Verigene 对常见病原细菌包括金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌（甲氧西林敏感和耐药），肠球菌属（*enterococci*）和肺炎链球菌（*S. pneumoniae*）的鉴定准确率较高[81]。非常见链球菌，如缓症链球菌（*Streptococcus mitis*）/口腔链球菌（*Streptococcus oralis*）和无乳链球菌（*Streptococcus agalactiae*），未检测或检测错误[81]。

Verigene 革兰阴性血培养试验，检测了 8 个种属和 6 个耐药基因，也在临床试验中被评估[82-85]。在这些评估中，Verigene 与传统鉴定方法的一致性为 87%～98%，虽然菌株数量相对较少，有些样本是加入的是标准品而不是临床样本。对抗菌药物耐药或敏感检测性能的报道有很多种，有些试验报道了敏感性和特异性，有一些报道了与传统方法的一致性[82-85]。最全面的评估是一项多中心研究，共计 1847 例血培养，包括 729 例前瞻性的新鲜培养物，781 例前瞻性的或冻存培养物，以及 337 例模拟培养物[86]。微生物鉴定阳性的一致性为 92.9%～100%；阴性的一致性为 99.5%（都是以传统鉴定方法为参考方法）。有意思的是，其中 26 例含有肺炎克雷伯菌的样本没有通过该方法检测出，之后发现其中 25 例中包括 Klebsiella variicola。耐药基因检出率为 94.3%～100%[86]。

如上述，与 Verigene 相比，FilmArray 一个板子可同时检测革兰阳性、革兰阴性细菌，以及真菌[87]。对 FilmArray 鉴定板的评估数据已发表。FilmArray 与传统鉴定方法的一致性为 86%～92%[87,88]。关于 FilmArray 检测耐药标志物的检测，仅有少量数据发表。与 Verigene 一样，明确此技术的性能特点之前需要更多关于耐药靶点的数据。

加速 Pheno 系统（Accelerate Diagnostics，Tucson，AZ）是一种新的用于血液中病原微生物鉴定和同时直接检测特定抗菌药物耐药性的商品化分析方法。在该系统的首次临床评估中，对 115 例由革兰阴性菌引起的血流感染进行了小规模试验[89]，该系统在微生物鉴定和抗菌药物耐药性标志物检测方面，与传统方法总体上高度一致。在第二项评价中，该系统与传统鉴定方法在属水平的鉴定上具有很高的一致性，准确率达到 100%[90]。抗菌药物敏感性检测的总体一致性为 91%～92%。在第三项评估中，共评估了 232 例血培养，分离出 241 株病原菌[91]。与传统的鉴别方法相比，报道的鉴别敏感性为 95.6%，特异性为 99.5%。与传统的药敏试验（AST）方法相比，Pheno 系统的总体一致性为 95.1%，分类一致性为 95.5%[91]。在最近发表的一项评估中，将接种的和新鲜临床血液培养与传统的鉴定和 AST 方法进行了比较，Pheno 系统对不同病原体的鉴定敏感性从 94.6 到 100% 不等[92]。革兰阳性菌 AST 共 4142 项检测结果，总体基本一致率为 97.6%，分类一致率为 97.9%[92]。革兰阴性杆菌 AST 检测结果共 6331 例，总体基本一致率为 95.4%，分类一致率为 94.3%[92]。GeneXpert（Cepheid，Sunnyvale，CA）拥有一种检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌中 mecA 基因的方法，该方法可与血液培养结合使用。与检测血液培养分离物中抗菌药物耐药性的其他方法一样，该方法不可取代传统的药敏试验，而是一种辅助试验，可快速检测耐药性（<2 h）。

（四）抗原检测

BinaxNOW 金黄色葡萄球菌试验是一种免疫层析分析，采用多克隆抗体检测金黄色葡萄球菌的特异蛋白，来区分血培养瓶中的金黄色葡萄球菌和其他革兰阳性球菌。目前 FDA 只批准用于 BacT/ Alert 血培养瓶。一项没有临床试验许可的研究采用 VersaTREK 血培养瓶，与培养和试管凝集试验相比，该试验敏感性为 95.8%，特异性为 99.6%，2 个试验均采用等量血液-液体培养基

混合物[93]。在第二项没有临床许可的研究中，该试验与采用 Bactec 血培养瓶的传统方法相比较[94]。在这项研究中，BinaxNOW 试验的敏感性为 97.6%，特异性为 100%。

(五)MALDI-TOF 质谱

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)，在血培养分离株的快速鉴定中被广泛研究。目前，FDA 批准了 2 家公司 MALDI-TOF MS 系统的仪器在美国上市，可用于鉴定在固体培养基上生长的菌株(也就是说，不是直接鉴定血培养中的菌株)，分别是 Microflex LT Biotyper (Bruker Daltonics，Bremen，Germany) 和 the Vitek MS IVD (bio-Mérieux，Marcy l' Etoile，France)。在一项早期研究中，阳性血培养瓶中 90% 的细菌可直接应用该方法进行鉴定[95]。其他的早期研究也表明，该技术能很好地从血培养液体样本中直接鉴定出细菌和真菌。一项关于 Biotyper 的研究评估了 MALDI-TOF(MS)对 212 例血培养中细菌性病原菌的鉴定能力[96]。其中有 42 例(19.8%)血液-液体培养基混合物中的细菌数量不足，无法应用 MALDI-TOF MS 进行鉴定[96]。对其余 170 例血培养中的病原菌，MALDI-TOF MS 与传统鉴定方法相比，准确鉴定细菌的一致率是 95.3%[96]。另外一项研究采用 Biotyper 方法分析了 330 例阳性血培养瓶[97]，其中 318 例转种后有菌株生长，12 例被认为是血培养仪报告的假阳性结果。对于后者，MALDI-TOF MS 与培养的结果完全一致[97]。318 例血培养转种后生长的均为单一菌种。与血培养的传统鉴定方法相比，MALDI-TOF MS 在种水平上的鉴定一致率为 83.3%，在属水平上的鉴定一致率为 96.6%[97]。

在对这 2 个 MALDI-TOF MS 系统最全面的比较中，对 Bactec 血培养仪报告的 202 例阳性血培养瓶，同时使用 2 个系统的 MALDI-TOF MS 进行检测[98]。在这项评估中，有 181 例为单一菌，21 例为复合菌。在 181 个单一菌中，Biotyper 准确鉴定出 171 个(97.8%)，而 Vitek 准确鉴定出 167 个(92.3%)[98]。2 个系统对复合菌的鉴定都不好[98]。虽然在这项研究中没有对鉴定时间进行评估，但之前的 2 项研究显示，与传统的方法相比，该方法能将鉴定时间缩短 26.5～34.3 h[99-100]。

尽管有这些结果，不能用这种方法进行抗菌药物敏感性试验，快速、准确的鉴定微生物病原体(和某些抗菌药物耐药性标记)的商品化分子试验不断涌现，这使 MALDI-TOF 是否是检测血培养的合适方法成了一个问题。毫无疑问，MALDI-TOF 的使用，就像任何比传统识别方法更早提供结果的方法一样，可以对临床诊疗产生积极的影响[101]。使用“涂抹板”方法来减少处理和检测阳性血培养肉汤的时间，实现在不到 4 h 的时间内鉴定细菌分离株[102]。尚不明确的是，与分子试验相比其是否具备优势，尤其是后者需要更少的处理和专业知识来操作，通常产生测试结果在不到 90 min。虽然一项单一的方法学对比研究显示，在革兰阳性菌的鉴定方面 Verigene 优于 MALDI-TOF[79]，但关于快速鉴定血液培养中微生物病原体的最佳方法，目前还没有足够的数据得出确切的结论。

(六)用血培养瓶进行直接快速的抗菌药物敏感性试验

大量研究都在探索能否采用传统方法(非分子生物学方法)直接对血液-液体培养基混合物(不需要次代培养)进行药物敏感性试验检测，以减少结果报告所需的时间。很明显，这种方法在理论上是不可行的。主要原因如下：①主要障碍是不能对血液-液体培养基混合物中微生物的数量按药物敏感性试验要求进行标准化。目前没有一个 CMBCS 系统是根据瓶中出现的微生物数量来报告阳性。血液标本中存在微生物的初始数量、微生物的代谢特点(如生长率和产气量)，报阳时每毫升液体中微生物数量均根据所使用的血培养系统的不同而变化。②检测少量血液混合物样本，含或不含附加剂，都是一个复杂的液体基质(如血液、液体培养基、抗凝剂和其他附加剂)，这种基质是不能用来进行商品化抗菌药物敏感性试验的。即使应用离心或其他程序，这种“基质效应”不能被完全消除或减轻。③或许这一点不重要，但是应该考虑血液中抗菌药物的存在。因为给药剂量达到或超过了能抑制病原菌生长的血药浓度，虽然液体培养基会稀释药物，但在血液-液体培养基混合物中仍有残留的抗菌药物活性[103]。④抗菌药物敏感性是一个会变的指标，折点的解释标准会随着时间改变而改变，因而需要对试验

方法进行反复验证，而这种药物敏感性试验方法在大多数设置上是不可行的。⑤监管障碍。大多数商品化药物敏感性试验的说明书中并不包括对血液液体培养基混合物直接检测，那样的检测属标示外使用，即没有临床试验批准的使用，在某些情况下，保险公司是不付钱的。⑥革兰阳性球菌比较特殊，污染率较高，因此药敏结果报告解释不太清晰[104]。⑦已发表的证据缺乏说服力，部分已发表的研究显示这些方法可用，而其他的研究却得出相反的结论。在这个循证医学的时代里，通过对文献的客观分析得出这样的结论：目前的证据不支持这种方法的应用。⑧当耐药基因的分子诊断比较普遍时，对于某些病原体，使用其他的直接抗菌药物敏感性试验的需求可能会迅速减少，尤其是革兰阳性球菌，而在其他病原菌如革兰阴性细菌中并非如此。

十、质量审核和标准

研究、记载和报道得最多的血培养质量指标是污染率。有一个长期的建议是住院患者血培养的污染率应保持在或低于3%，但大量的历史数显示皮肤消毒剂并不像氯己定一样有效。使用氯己定需要进行培训，以实现有效的皮肤消毒，应该在一致的基础上使污染率达到1%。高于3%的污染率可能是由于污染物、错误的静脉穿刺技术或不当操作。1%这个数字对于门诊特别是急诊科患者设置得是否合理是另一个有待考证的问题。为了患者的安全、医疗质量和花费，将最低的污染率作为目标是有道理的，但应考虑到在不同的环境中污染率也应有所不同。

另一项常用的质量评估指标是每次败血症期采集血培养的数量。如前所述，对血培养结果的解释主要取决于足够的血液量和多于1次的培养次数。单次血培养分离微生物的临床重要性不可能由分离菌的种类决定。同样，采集多于必需次数的血培养也是浪费的，而且还会引起失血性贫血，导致分离出更多的污染菌。基于这2方面的原因，实验室应监测每次败血症期采集血培养的数量。

关于要提取的血液培养物的数量，常常出现2个问题。首先是“监测”血液培养物的应用。这个术语有2种不同的用法。第1种用法是在没有临床症状或体征的情况下抽取血培养，以便更早地发现菌血症或真菌血症，这种用法更符合“监测”一词，而第2种方法是重复抽取血培养，以记录菌血症或真菌血症的清除情况，后者也被称为“治愈检测”血培养。在接受造血干细胞移植的患者中，对血液培养的真实监控得到了最广泛的研究，而多项研究表明这种做法几乎没有益处[105-107]。这种方法也曾在危重患者中进行过研究，但再次被证明很少或没有临床益处[108]。对治愈性血培养的检测通常也是如此，大多数非复杂性感染导致的菌血症患者不能从这些试验中获益。如有例外，包括金黄色葡萄球菌菌血症或血管内感染的患者，如感染性心内膜炎[12,109]，持续性感染，或持续阳性的血培养表明耐药微生物是感染的原因。

第3个重要指标是血培养瓶中有足够的填充量。血液量不足的血培养瓶会减少病原菌的检出，应告知送检医生，并建议重新采集血培养。足量采集血培养仅适用于成人患者；由于儿童或婴儿的采样量很少，这个度量标准并不适用于监测填充是否足量。评估填充量有几种方法。肉眼观察是否满足采样标准很容易，但因患者体重、培养瓶的壁厚并不总是一致的，因此该方法并不适用。相比之下，称重和与已知标准比较重量更为客观，但是血培养瓶没有统一标准。一项初步研究提到Bactec FX系统可以自动监测瓶内血液样本体积[110]。自动检测过程将消除受试者间的差异，并且可以采集到更好的数据。填充量应该是通过时间和位置进行监测的，以便识别任何形式的填充不足(或过量填充)，并对其采取正确的纠正措施。

十一、小结

在临床微生物实验室中，菌血症和真菌血症的检测仍有重要作用。尽管很多新技术不断被发展和引进，对于患者的常规医疗，选择血培养方法仍是唯一可行的方案。分子检测方法显现出潜力，但现有方法没有血培养检测的敏感性强(除外几种特定的病原体)，只能提供关于抗菌药物敏感性的有限信息，如果单独使用分子方法，不能保留菌株用于流行病学调查，同时也不能检出复合菌，且在常规工作中开展费用较高。尽管如此，作为抗菌治疗管理工作的辅助工具，在部分患者身上

可以发挥早期特异性治疗的作用。其他方法，例如，应用 MALDI-TOF MS 对固体培养基上的微生物进行快速鉴定也能达到类似结果，但是目前 FDA 并没有批准该技术用于血培养报阳后，分离前培养液中病原菌的直接鉴定。经验显示，新的方法很少能取代老的方法，但可以作为辅助手段。因为从血液分离病原菌具有多种临床作用——预后、指导治疗、监测疗效、流行病学分析，实验室检测细菌血症和真菌血症的任何方法都必须满足上述的每一个条件。在短期内，任何新技术都不可能完全取代血培养。目前，新技术和血培养正被整合成为一种检测策略，且两者都能发挥各自的优势。

参考文献请扫二维码查阅

第 5 章　细菌和真菌鉴定系统*

KAREN C. CARROLL，ROBIN PATEL

（徐元宏　译；李向阳、王辉　审校）

传统上，细菌和真菌的鉴定是基于常规生化管的反应，将其结果和历史积累的种属预期反应谱相对照而得出鉴定结果。由于临床需要更快、更简单的检测方法，因此出现了以手工生化为基础的试剂盒和半自动或自动化的检测仪器。首次微生物学的自动化始于 20 世纪 70 年代早期出现的半自动血培养仪（第 4 章），随后出现了细菌鉴定和药敏仪器，更加快速的半自动和自动细菌鉴定和药敏检测仪的应运而生，主要依靠微生物的生化特性、脂肪酸构成谱和（或）其他代谢特性来鉴定。商业生化平台可能包括决策支持软件，该软件把鉴定药敏结果、耐药监测策略、治疗指南整合了起来。

大多数生化鉴定方法的主要限制在于获得准确结果所需的时间较长。近期应用的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法（matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry，MALDI-TOF MS），通过分析细菌或真菌细胞的蛋白组学进行鉴定。MALDI-TOF MS 已被引入多家临床微生物实验室，广泛用于鉴定细菌和真菌病原体，快速且经济。对易于鉴定的病原体，可继续使用常规快速生化反应（如氧化酶、触酶和凝固酶），以降低对 MALDI-TOF MS 的需求度。对于具有挑战性的微生物鉴定，可使用大范围 PCR 测序和微生物特异性技术等以核酸为基础的方法，抑或仍旧需要借助于生化反应试验。基于 DNA 扩增测序的方法不一定需要最佳生长期的病原体培养物，甚至无须活的微生物，同时可实现实验室间数据交换，协助定义微生物间的分类学关系。

大范围多重分子综合症状检测板可用于以下几个方面：①鉴定血液培养病原体及其关键耐药标志物；②检测细菌性下呼吸道感染；③鉴定与胃肠道疾病相关的细菌、病毒和原虫及其毒素。致关节感染和其他综合征的病原体检测板也包括在此类检测系统中。本书将陆续详细介绍以上功能测试板，本章节在此不再讨论。

一个实验室无论是使用人工方法还是自动化、生化、蛋白质或以 DNA 为基础的方法，都应采用相同的基本原则科学鉴定微生物。本章将概述临床标本中细菌和真菌的鉴定技术。有关自动化血培养系统（第 4 章）、药物敏感性试验（第 74 章）、免疫分析（第 8 章）、分子诊断（第 7 章）和分枝杆菌检测（第 31 章）讨论内容见于本书的其他章节。

一、微生物鉴定系统

（一）鉴定方法和机制概述

一直以来，微生物的鉴定采用现在称之为“常规检测”的方法，包括试管培养基中的反应和生理特性的观察，如菌落形态、溶血特点和气味，结合革兰染色、凝集试验和生化特征。多年来，常规使用生化反应的鉴定方法趋于微型化和便捷化，并发展成可以实现工业标准化生产的系统。依赖系统的方法基于一组经过精心选择的具有阳性与阴性反应结果的底物，这些方法检测生成的代谢谱与已有数据库进行比对得出结论。

生化谱是依据各种微生物对于系统中每种底物的反应来确定。反应的准确性取决于用户是否遵照制造商的要求进行操作，包括接种物制备、接

*注：本章包含 Karen C. Carroll 和 Robin Patel 在本手册第 11 版第 4 章中呈现的部分内容

种浓度、培养条件和结果解释。大多数系统依赖于1个或多个指标的组合，其中包括：①底物利用后产生的pH变化；②酶促反应释放显色或荧光化合物；③在各种碳源存在时，以四氮唑为指示物的代谢活性；④挥发性或非挥发化合物的检测；⑤可见生长的识别。微生物鉴定的附加生化试验可能还包括对特定的底物出现阳性反应的其他方法。

虽然对"快速"的时间长短没有正式的定义，但大多数微生物学家期望快速的系统能在4 h或更短时间内提供可用的结果。通常微生物的代时(通常是20 min或更长时间)不允许使用那些依赖微生物生长与否的检测方法在这一短时间内产生可检测到的生化反应。为了克服这一问题，快速检测系统制造商们使用全新的底物，检测待测菌产生的酶，从而在4 h内检测出应答反应。

基于MALDI-TOF MS的蛋白质组学分析能够在几分钟之内完成细菌和真菌的鉴定，因此，适合大多数临床微生物学实验室应用。通过扩增特异基因目标序列的分子生物学方法能够可靠地区分菌属和种。该方法和自动测序技术现已被用于常规方法难以鉴定的微生物检测。蛋白质组学和分子生物学方法极大地拓展了临床对发病机制的认识，甚至在某些情况下纠正了以前的错误分类。在微生物培养生长过程中进行鉴定的代谢组学分析方法，目前尚处于起步阶段，将来亦有可能应用于临床。表5-1对可用于微生物鉴定的技术进行了总结。

表5-1 微生物的鉴定技术

系统反应性	是否需要生长	分析物	阳性结果的指示	系统举例
pH为基础的反应(大多数15～24 h)	是	碳水化合物利用	pH改变导致颜色变化，碳水化合物的利用=酸性pH；蛋白质利用或含氮产物释放=碱性pH	API、Crystal、Vitek、MicroScan传统板、Phoenix板，Sensititre板
酶谱(大多数2～4 h)	否	固有酶	无色基团被适当的酶水解后，释放出显色或荧光基团而发生颜色改变	Crystal，Vitek，MicroScan快速试剂，Phoenix，Sensititre，IDS
碳源利用	是	有机产物	颜色改变是由于微生物的代谢活性，把电子转移到无色四氮唑标记的碳源上而将染料转变为紫色	Biolog
挥发或非挥发性化合物的检测	是	细胞脂肪酸	对检测终产物进行色谱跟踪，然后与已知数据库做比较	MIDI
检测可视化生长	是	各种底物	在出现某底物时，菌落生产一定的浑浊度	API 20C AUX
DNA靶序列测定	否	核酸	电泳谱或碱基的原始序列	实验室开发的测序：MicroSeq，GenBank、RDP、RIDOM、SmartGene
MALDI-TOF MS	是	蛋白	频谱中的质谱信号模式	实验室开发的系统：Bruker，bioMérieux，Andromas，中文系统

(二)系统构造

微生物鉴定系统主要分为手动或自动化系统。手动系统需要技术人员读取并解释测试结果，而自动化系统提供了一套无须手动的方法，使技术人员有更多的时间处理其他事务，并为实验室提供更高水平的标准化操作。对所有鉴定系统而言，确保准确性的基石是数据库的强大和实用性。数据库主要采用已知的与临床相关的菌株及大多数菌种的模式株的数据来构建。在某些情况下，在某类菌种被添加到数据库前，需要利用似然分数确认其与同一类群中其他菌株的相关性，包括比较这一新菌种与同种菌典型培养物之间的特征。商业化鉴定系统往往难以可靠地鉴定出少见或常见但特征不典型的微生物，除非该系统数据库已包括该微生物的典型特征数据。

数据库中物种的数量可能差异很大，从某些手工检测仅有数个菌种到自动化仪器系统的数千个菌种不等。对于大多数商业化系统，数据库维护是一连续的过程，制造商定期提供的更新软件

应整合分类学上主要变化，包括：识别错误条目后，应立即对数据库进行更正，以及新描述的属和种应尽快添加到数据库中。有的系统允许用户进行自行更改，甚至可建立本实验室自己的数据库（在此称为"用户开发"数据库），有的系统则要求制造商进行操作更改。

系统鉴别倚重通过计算机运算辅助完成的决策程序。有时，这些鉴别内容或参数被编译成一组查询索引，用于将生物特征数据手动转换成相应鉴别参数。贝叶斯定理或其修正定理通常是数据矩阵算法构建的基础。

贝叶斯定理属于一种统计学方法，生化鉴定系统制造商根据临床分离的未知微生物产生的生化反应谱数据，通过这些统计学方法达到鉴定特定分类群的目的[1]。若要运用贝叶斯定理获得正确的结论，需要考虑 2 个重要问题：①$P(t_i/\mathrm{R})$是指一个具有测试模式 R 的生物体归属于类群 t_i 的概率；②$P(R/t_i)$是指类群 t_i 中的成员具有测试模式 R 的概率。测试前，人们假设待测分离菌株属于任一类群的概率均等，且每项用于鉴定待测菌株的测试项相互独立。在这种情况下，贝叶斯定理可写成：$P(t_i/R)=\dfrac{P(R/t_i)}{\sum_i P(R/t_i)}$

通过观察常规生化试验得出的鉴定参考表，可以获知预期的类群 t_i 群体的鉴定谱或结果（例如，大肠埃希菌吲哚阳性和柠檬酸盐阴性）。公式中 R 代表测试模式，包括 R_1、R2，…Rn；其中，对于一个给定的类群，R_1 是测试 1 的结果，R_2 是测试 2 的结果，以此类推。最终，我们将相应的百分数（例如，t_i 具有 R_1 测试模式的似然比等）代入上述公式，得到准确的类群鉴定结论。

当系统提供的结果模棱两可时，临床微生物学家不能只依赖于这些可能性与百分比得出结论。临床标本分离出的细菌，在商业化鉴定系统中可能时常会发生超出预期的反应，尽管它们有时会给出某种合理的反应结果（例如，乳糖阳性沙门菌属或 H_2S 阳性大肠埃希菌）。即使是最可靠的检测系统给出的结果有时也会有误导的可能。在这些情况下，必须使用另一种替代性识别鉴定方法。D'Amato 等详细介绍了这些鉴定系统是如何使用数据库和概率矩阵识别、鉴定出未知分类群的[2]。

商品化鉴定系统制造商们非常重视客户的反馈信息。实验室与厂家对产品有关问题应及时进行沟通，如一种新方法或系统在应用时出现异常生物鉴定结果等。制造商很重视客户的满意度，大多制造商们都会愿意协助解决问题，或者参与能够提升其产品优势的项目。

二、表型鉴定系统

（一）自动化仪器

在过去的 50 年中，自动微生物鉴定和药敏试验系统逐步成熟。本节将突出介绍几个较为实用的系统的鉴定特点，第 74 章将讨论它们的药敏试验性能。随着自身产品的不断更新，仪器公司鼓励感兴趣的读者去了解由厂家提供的最新产品更新信息。随着 MALDI-TOF MS 技术的逐渐普及，仪器公司将通过更新和拓展药敏试验组合设置来逐步强化高性能仪器与蛋白质组学相结合的鉴定体系。

（二）Vitek 系统

Vitek 系统是第一台正式应用于临床微生物鉴定的自动化仪器（bioMérieux，Inc.，Durham，NC），至今已有 40 多年。该系统最初由美国航空航天局研发，并用于检测在太空探险中的宇航员所遇到的异常生物体。该系统目前的版本叫作 Vitek 2 系统，包括个人电脑、读板器/孵化器和智能加载平台。智能加载平台是一个样品制备模块，用于读取加载标本的条码标签确定试样并标准化接种。根据实际的仪器大小和需要的测试数不同，有多种系统可用于选择（表 5-2）。仪器可兼容 15、30、60 或 120 张卡（Vitek 2 XL）等型号。1 台个人电脑可以同时连接 2 台读板器/孵化器。该电脑具有与实验室信息系统相连接的双向接口功能（www.biomerieux-usa.com/clinical/vitek-2-healthcare）。

Vitek 系统包括以下菌属鉴定卡：厌氧菌、棒状杆菌、酵母、奈瑟菌属、嗜血杆菌属和其他苛养菌、革兰阳性菌和革兰阴性菌（肠杆菌科、非肠杆菌科和高致病性微生物，如布鲁菌和弗朗西斯菌）（表 5-2）。通过基于 pH 改变的比色法检测多种底物的代谢变化来鉴定这些微生物。其生化反应包括碳水化合物同化和发酵、脱羧、氨基酸利用、酶促反应（氧化酶、芳基酰胺酶），以及诸如尿素和

表 5-2 鉴定细菌和真菌的自动化鉴定系统的特点[a]

仪器制造商	设备	原理	检测板种类[b]	数据库中的生物体（分类数量）	测试数量	孵育时间(h)	系统软件
bioMérieux	Vitek 2 XL Vitek 2 60 Vitek2 Compact 60 Vitek 2 Compact 30 Vitek 2 Compact 15	比色碳源利用率；酶活性；电阻	GP CBC BCL GN NH ANC 酵母菌	124 64 52 162 32 89 54	43	≤8	Observa；高级专家分析系统
Beckman Coulter	MicroScan WalkAway plus	培养过夜，比浊检测碳源的利用情况；酶活性；快速板采用预制的酶荧光检测	GN Convent GN Rapid GP Convent GP Rapid 酵母菌 厌氧生物 NH	136 120 51 53 37 52 11	33 26 27 26 27 24 18	2.5 到 (16～18)	LabPro
BD 诊断	BD Phoenix	比色法和荧光检测	GP GN 链球菌属 酵母菌	140 161 27 64	48	8～16	BDXpert，BD EpiCenter
Thermo Fisher Scientific	ARIS	荧光检测	GP GN	41 137	32 32	18～24 5～18	SWIN
Biolog	OmniLog	碳源利用，通过检测四氮唑紫的还原反应	GP GN 酵母 丝状真菌	2900	95	2～24[c]	GEN Ⅲ RetroSpect 2.0
MIDI，Inc.	Sherlock 微生物鉴定系统	气相层析分析细胞壁脂肪酸，霉菌酸的 HPLC 分析	GP GN 酵母菌 分枝杆菌	1500 60	NA	24[c]	多种数据库可用

注：[a] 数据来自：http://www.bd.com/ds/productCenter/IS.asp；http://www.biomerieux-usa.com/；https://www.beckman-coulter.com/wsrportal/wsr/Diagnostics/index.htm；www.biolog.com；http://www.thermofisher.com/us/en/home.html；http://www.midi-inc.com/；[b]GP. 革兰阳性；GN. 革兰阴性；NH. 奈瑟菌属，嗜血杆菌；ANC. 厌氧菌；Convent. conventional（常规）；ID. 鉴定；AST. 药敏试验；HPLC. 高效液相色谱；NA. 不适用；[c] 必须在特定培养基上过夜培养，检测需时约 2 h

硝酸盐等混合反应等；其鉴定微生物的耗时因检测卡和范围而异，从厌氧菌、棒状杆菌、奈瑟菌和嗜血杆菌的 6 h 到酵母菌的 18 h 不等。

该系统还包含一套先进的专家分析系统，可匹配 4000 个生物体表型与 55 000 个 MIC 分布（8.01 版软件）。若生物体表型和 MIC 值匹配则标记为绿色，且无须用户验证。黄色（代表 MIC 结果与表型不一致）、红色（代表未知表型）或紫色（代表数据库未收录的表型）标记的样本要求用户复查并解决相应的问题（www.biomerieux-usa.com）。

随着新功能的增加和软件版本的更新，不断有文献报道 Vitek 2 系统及其他自动化系统。新的文献也在重新比较这些系统与分子阵列平台和 MALDI-TOF MS 性能。新近的一些研究已经开始比较几款系统平台的各项性能指标；这些信息对实验室采购一台合适的鉴定系统非常有参考价值[3-7]。

一项著名的多中心研究比较了 Vitek 2、MicroScan 和 BD Phoenix 3 家应用最广的鉴定系统，用以测试 11 000 份地域分布各异的分离菌株[8]。尽管该研究的重点是对多重耐药的病原体检测，但其对上述系统在种（species）的水平鉴定鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的能力也做了评估。总体而言，这 3 家系统平台在微生物种的水平鉴定率的

一致性为99%[8]。相较于Phoenix和Vitek 2，MicroScan鉴定鲍曼不动杆菌的错误率较高，16份菌株被错误鉴定为志贺菌[8]。Vitek 2在鉴定鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌方面表现最佳[8]。3家系统对其他种水平的菌株鉴别错误都较少见。该研究中出现争议的鉴定结果，是通过MALDI-TOF MS和(或)16S rRNA基因测序方法予以最终确定的[8]。

Ayeni等研究比较了甘露醇盐琼脂培养生长法、Vitek 2和MALDI-TOF MS(Bruker Biotyper 2.0，软件v3.0)与部分16S rRNA基因测序方法的准确度，鉴定了171份(13个独特种)非金黄色葡萄球菌分离株。MALDI-TOF MS正确鉴定出78%的分离株，而对25%的分离株做出了错误鉴定，主要包括阿尔莱特葡萄球菌(*S. arlettae*)、鹑鸡葡萄球菌(*S. gallinarum*)和克氏葡萄球菌(*S. kloosii*)[9]。在该研究进行时，鸡沙门菌还未收入其数据库。Vitek 2能够正确鉴定出88%的分离株。所有菌株在甘露醇盐琼脂上生长均呈黄色菌落，表明这些分离株不能被认为是金黄色葡萄球菌，需要通过其他可靠的鉴定方法进行确认[9]。Ayeni等对Vitek 2的研究结果，比Paim等的研究更进了一步，后者对36份凝固酶阴性葡萄球菌在种水平上的鉴定正确率仅为78%[10]。

自本手册上一版至今，许多关于自动化检测系统和手工试剂盒的最新文献都报道了酵母菌平板的鉴定准确性问题，并与其他检测方法包括MALDI-TOF MS和分子检测进行了比较。Mizusawa等研究证明到目前为止，现有的自动鉴定系统或API 20C AUC(bioMérieux Marcy l'Etoile，France)均无法准确鉴别具有多重耐药的酵母菌，即耳念珠菌(*Candida auris*)[11]。在所有现有鉴定系统中，该病原菌被错误报告为红酵母菌(*Rhodotorula*)或另一念珠菌种[11]。同样有报道指出Vitek 2将高里念珠菌(*Candida guilliermondii*)和其他酵母菌错误鉴定为无名念珠菌(*Candida famata*)[12-14]。其他手动系统(API ID32C和AuxaColor)也难以正确鉴定无名念珠菌[15]。表5-3总结了鉴定其他酵母菌的各种系统和试剂盒的性能指标。

表5-3　鉴定其他酵母菌的各种系统和试剂盒的性能[a]

评估系统	参考方法	菌株数	评估的分类数	总正确率(%)	评价	参考文献
Bruker Biotyper 3.1[b] Vitek MS[c] Phoenix 100 Vitek 2 YST ID	5.8 S rRNA基因测序 18S、28S rDNA ITS区	272	34	92.5 79.5 89.0 74.5	只有布鲁克可以区分副念珠菌(*C. parapsilosis*)。没有系统可以区分C. guilliermondii复合体	187
Phoenix 100 Vitek 2 YST ID	18S、28S rDNA ITS区；D1/D2 26S rDNA	351	49	84.0 79.0	Phoenix错误鉴定率更高，$P<0.05$；报告结果更快，$P<0.001$。2种系统鉴定常见酵母菌性能相当	188
Phoenix 100 Vitek 2 YST ID	18S、28S rDNA ITS区	250	29	94.4 89.6	Phoenix 4～12 h出结果 Vitek 2 18 h出结果	15
Bruker Biotyper Vitek MS API ID32C Vitek 2 YST ID	生化特性已知的QC株	124	7 念珠菌种	98.4 97.6 99.2 100.0	相较于常规生化反应方法，质谱法鉴定性能相当，且鉴定时间更短	189

注：[a] 仅包括涵盖广泛临床分离株的研究，并对所有测试分离菌株采用相同参考方法；[b] 数据库版本3.1.66；[c] 临床使用数据库v 2.0；使用SARAMIS RUO数据库可提高性能

(三)MicroScan

Beckman Coulter公司(Indianapolis，IN)制造了MicroScan WalkAway系统，其可用的仪器型号包括WalkAway-40 plus和WalkAway-96 plus，分别可容纳40和96个标本。AutoSCAN-4系统是专为标本量少的实验室设计的小型化仪器，它可在几秒钟内读取一个样本；该仪器拥有一个控制前面板，其系统包括电脑键盘、显示器和Labpro软件。MicroScan系统采用全系统条形码

认证方式以减少潜在的手动标记错误和(或)鼠标键入失误等(www. beckmancoulter. com)。

目前已有多种类型的 MicroScan 鉴定板,包括常规型、快速型和特定型,有 30 种以上规格。常规鉴定板包含传统生化鉴定和微量肉汤稀释法 MIC,并可实现肉眼观测。快速鉴定板可在 2.0～2.5 h 内完成微生物的鉴定,肉汤稀释法药物敏感性试验可在 4.5 h 到 16～18 h 实现。最终的检测结果可在 18 h 内给出。特定鉴定板可用于酵母、厌氧菌、苛养革兰阴性杆菌和链球菌等的鉴定(www. beckmancoulter. com)。常规鉴定板包含改良的生化与色原试验,用于范围广泛的菌种鉴定(表 5-2)。快速鉴定板是利用荧光底物或荧光指示剂检测底物利用与特定代谢产物生成后出现的 pH 变化来进行鉴定。与其他的系统相似,其鉴定原理亦是基于底物利用(率)、pH 变化,以及在特定抗菌剂下的生长情况等的检测。根据所使用的鉴定板的不同,结果可在 35℃解育后 2～18 h 获得。除快速型鉴定板外,鉴定结果亦可手动读取,这有利于异常反应及规模小的没有自动化系统的科室。有些鉴定板可以在室温下储存长达 1 年。

该公司还提供一种称为"PROMPT"的接种系统,以替代调节菌液至 0.5 麦氏度标准的必备装置。用户可挑取 3 个与接种针大小相同的已分纯的单个菌落,放入装有 30 ml Pluronic-D 水溶液的小瓶中;摇匀后,悬浮液倒入分注槽进行后续的仪器接种操作。还有一种名叫 RENOK 的接种器,可以同时完成 96 孔板接种,并可与所有型号的 MicroScan 鉴定板条相兼容(www. beckmancoulter. com)。

带有 Alert_{EX} 的 LabPro 软件包含有基于 CLSI 建议的预定义标准数据库。用户可以按需求自定义规则以匹配处方和感染控制的预警或其他用途。当某分离株需要关注时,该软件会自动通知用户。其注意事项可能包括必要的补充试验、质量控制或存在可执行的其他操作选项等。其流行病学管控特征可以为感染控制和用药提供参考信息。其抗生素谱组成是基于 CLSIM39 文件标准建立[16](www. beckmancoulter. com)。

最近有关 MicroScan 系统(和 API20E)的文献着重指出其存在难以鉴定不常见病原体如劳氏菌(*Raoultella species*)的问题[17],以及将 Brucella melitensis 错误地鉴定成了 Bergeyella zoohelcum[18]。如上所述,快速酵母鉴定(identification,ID)板的数据库中没有耳念珠菌(*Candida auris*),该菌株被此系统错误鉴定为是无名念珠菌(*C. famata*)或其他种属[11]。

(四)BD Phoenix

BD 凤凰自动微生物系统分别于 2001 年和 2004 年在欧洲、美国上市。目前,整个系统包括仪器、各种测试板、用于接种的 AP 仪器(2008 年面世)和 BD EpiCenter 数据管理系统(http://www. bd. com/ds/productCenter/IS. asp)。Phoenix 仪器可同时测试 99 个测试板和 1 个对照板。最近推出了模块化程度更高的 M50 系统,可容纳的鉴定板数量是 M100 的 1/2。多种测试板可用于革兰阳性和革兰阴性病原体 ID 和(或)抗微生物药敏试验(antimicrobial susceptibility testing, AST);酵母鉴定板于 2011 年问世。ID 和 AST 的组合板由 136 孔组成,其中包括 51 个 ID 孔和 85 个 AST 孔。通过对各种底物反应进行荧光和比色相结合的检测方法,实现待测样本的 48 种生化试验检测。革兰阴性菌与革兰阳性菌的鉴定仅需 2～12 h,而酵母菌的鉴定需要 4～15 h。当检测数据生成后,BDXpert 系统软件将进行结果解释。用户可直接通过 BD EpiCenter 或通过实验室的信息系统,完成最终的结果报告。

BD EpiCenter 多用户系统是一个数据管理软件系统。它具有双向的实验室信息系统界面和工具,允许用户创建特定的、机构内 AST 规则和其他报告类型等。这些工具或程序还允许用户分析流行病学趋势和生成来自多个 BD 仪器的检测报告,这种功能不仅适用于仪器,还包括新的 BD Bruker MALDI Biotyper 质谱仪。EpiCenter 设有 BD Sentinel 功能选项,该选项允许将消息发送到特定的用户客户端及实验室中多个 EpiCenter 工作站,并允许通过电子邮件将消息分发至计算机、PDA 或短信、电话,以便感染预防医生、药剂师和临床医生可以实时接收重要信息。

与其他系统相比,Phoenix 系统在工作流程中碰到的首要问题之一是其需要手工准备测试板,这导致其准备时间比其他仪器长(如 Phoenix 系统需时 3 min,而 Vitek2 系统仅需 1.5 min)[19]。

2008年，BD推出的AP仪器大大缩短了手工准备板的时间，并使接种准备操作更加规范化。用户可在一个测试架子上放置能够用于多达5个菌株测试的ID和AST板，随后该测试架送至AP仪器，由AP系统自动标准化接种ID板和AST板，以及AST氧化还原指示剂。用户必须手动转移测试架至接种站，扫描条形码，并将ID和(或)AST培养液加入鉴定板条，密封后，置于Phoenix仪器中(http://www.bd.com/ds/productCenter/IS.asp)。Junkins等的研究表明，使用AP系统可减少50%的操作时间[20]。

最近有关生物识别的Phoenix系统的大多数文献比较了它与其他多种系统，包括MALDI-TOF MS和分子检测等，对比酵母菌鉴定的准确性。表5-3汇集了这些报道。

(五)Trek诊断系统

Trek诊断系统(现属于Thermo Fisher Scientific公司)以其广泛的、可定制的微量肉汤稀释法药敏板条(第72章有讨论)著称。该公司生产的鉴定板(Sensititre ID板)所包含的底物项目较前面的系统少，能够鉴定最常见的需氧革兰阴性和革兰阳性菌。独立的革兰阴性和革兰阳性板包含32个含荧光底物反应孔，鉴定时间短至5 h(革兰阴性菌)，并可根据需要，延长孵育至过夜。每个ID微孔板可以测试3种不同的菌株。ID板和药敏MIC板可在同一仪器上读板。此外，实验室可以购买Sensititre AIM自动接种仪和浊度仪，以提升接种操作的标准化。Sensititre ARIS 2X是一台完全自动化的可置于实验台面的便携仪器，可孵育和读取条形码。ARIS仪器要求用户购买OptiRead自动荧光板读数系统。该系统可容纳64块板，适用于所有的TREK板，包括MIC板、折点板和鉴定板。一台仪器每天可以运行多达192个测试。ARIS装置连接着装有SWIN软件的计算机上，SWIN软件系统为专家分析系统，用于板条测试结果解读。此外，该公司SWIN软件还装有流行病学分析模块，用户可设计5种定制报告以跟踪工作量、MIC值及菌株的流行病学特征。近期未见关于评估Sensititre革兰阴性鉴定板的论文发表。墨西哥的一项研究评估了Sensititre革兰阳性鉴定板与API STAPH v4.1板条用于常见葡萄球菌的鉴定情况[21]。不一致的菌株通过PCR和16S rRNA基因、*sodA*和*tuf*基因的部分测序来鉴别。Sensititre板鉴定正确率仅69%，API可达90%，这表明该板条用于鉴定这类革兰阳性菌的能力有限[21]。

(六)Biolog微生物鉴定系统

Biolog微生物鉴定系统(Biolog，Hayward，CA)于1989年面世，目前尚未获准用于人体体外诊断，但已广泛用于农业和兽医实验室。该系统除了能够测定27种化学分析法(如乳酸和盐耐受性)敏感性外，还可以借助微生物利用或氧化71种碳源的能力来鉴定相关微生物。其96孔微孔板采用掺入每种底物中的四唑紫的还原反应表示碳源/化合物的消耗利用[22]。这种“碳指纹”数据由该仪器配备的软件进行分析处理，并与包括超过2900种需氧菌、厌氧菌、酵母菌和真菌的扩展数据库(GEN Ⅲ)进行比对[23]。该系统有多种不同配置、不同级别自动化程度和多个鉴定数据库可供选用，其中包括危险病原体数据库，该数据库有报道被用于鉴定类鼻疽伯克菌(*Burkholderia pseudomallei*)，该菌是自中美洲进口的宠物鬣蜥感染源[24]。

全自动GEN Ⅲ OmniLog ID系统可孵育和监控多达50块Biolog微孔板，并可以快速鉴定需氧菌[23]。OmniLog Plus ID系统还可进一步鉴定厌氧菌、酵母和丝状真菌。专用软件工具Retro-Spect 2.0支持数据管理和报告，并允许用户通过生成自定义报告进行趋势化分析和跟踪微生物数据。该系统要求菌株在Biolog通用生长平板上传种培养后再进行测试[22]。在过去的20年，不断有文献对Biolog系统进行评价[22,24-26]。最近有文献评价了其鉴定“非典型”临床菌株的准确性，“非典型”临床菌株即在常规鉴定数据库中通常不包括的菌株，如某些需氧菌放线菌、芽胞杆菌和苛养革兰阴性杆菌[22]。这项159株菌的研究比较了OmniLog系统与16SrRNA基因测序和广泛的生化检测分析；与常规方法相比，Biolog系统的总体准确度为68.3%[22]，其对需氧放线菌的鉴定性能表现最佳(鉴定准确度高达100%，而16SrRNA基因测序准确度为74%)，但其对苛养革兰阴性杆菌的鉴定性能较差(20%)[22]。有项研究将配套有MicroLog 3软件的Biolog GP2板与API50CHL、16S rDNA测序及种特异性PCR方法进行了比较，用以鉴定29种乳酸菌[27]。总体而言，与分子

方法相比，Biolog的准确性为73.0%～99.9%，与API50CHL的性能相似（准确性为78.2%～99.9%）[27]。肠球菌属鉴定表现最佳。Wragg等[28]将Biolog GEN Ⅲ MicroStation半自动鉴定系统（GEN Ⅲ数据库，5.2.1版本）与MALDI-TOF MS和16S rRNA基因测序进行了比较，用于鉴定从临床兽医标本中获取的100种细菌。其中，正确鉴定出56种分离株至种水平、29种分离株至属水平，无法鉴定者有15种（数据库中有该15种菌株信息）。与正确鉴定出的分离菌株相比，后一种菌株被描述成"代谢活性相对较低"，但没有一份分离株被错误鉴定[28]。

（七）MIDI微生物鉴定系统

MIDI公司（MIDI，Inc.，Newark，DE；www.midi-inc.com）推出了2套微生物鉴定系统。Sherlock微生物鉴定系统（microbial identification system，MIS）于1991年面世；它是惠普公司（现为安捷伦科技公司）与特拉华大学植物病理学系共同合作的成果。该系统借助气相色谱法（chromatographic，GC）分析细胞脂肪酸，可以鉴定广泛的细菌病原菌（约1500个种）[29]。在提取之前，将待测菌株传种至特定培养基上孵育24 h，再在试管中加入特定的生物量（biomass）用于脂肪酸提取，然后进行气相色谱检测。该过程提取一批30份样品，大约需要90 min，并在此过程中杀灭病原体。每份样品的分析运行时间为9 min。Sherlock软件采用脂肪酸定性和定量匹配模式与数据库中的已知菌株比对而鉴定微生物。Sherlock MIS系统被环境实验室（植物病理学）及部分临床实验室当作参考方法。Sherlock MIS于2005年获得AOAC International和FDA 510(k)批准，用于鉴定炭疽芽胞杆菌[30]。自2003年起，Sherlock分枝杆菌鉴定系统（mycobacteria identification system，MYCO-LCS）一直运用高效液相色谱（high performance liquid chromatographic，HPLC）检测细胞霉菌酸成分分析鉴定分枝杆菌和相关菌种。在提取之前，将待测微生物在35～37℃下培养于Middlebrook 7H10（或7H11）琼脂，直至观察到可见菌落生长。在执行HPLC分析前，取极少生物量（在无菌接种棒末端近乎可见的生物量）转移到培养管中，进行霉菌酸的提取。该提取操作处理一批30份样品大约需要90 min，这一过程可同时杀灭待检病原微生物。每份样品的分析运行时间为15 min。Sherlock MYCO-LCS软件采用霉菌酸定性和定量匹配模式与数据库中的已知菌株比对而鉴定微生物。医院和公共卫生实验室的临床实验室均使用Sherlock MYCO-LCS作为参考检测方法。Sherlock MYCO-LCS于2003年获得FDA 510(k)批准，可从固体生长培养基中鉴定结核分枝杆菌，并可将牛分枝杆菌BCG与MTB复合群分开。尽管Sherlock MYCO-LCS也已用于直接从液体生长培养基中鉴定分枝杆菌培养物，但尚未就此获得FDA批准[31]。

（八）BIOMIC V3成像系统

BIOMIC V3是一种数字成像系统，可以自动读取和解释纸片扩散试验和其他市售人工鉴定与药敏试剂盒或测试的结果。该系统需要用户在进行离线培养后，将平板或测试板手工放入仪器中检测。BIOMIC设有读取API板、RapID测试（Remel）和Crystal板（Becton Dickinson）的程序，也可以自动读取Etest的MIC、微量肉汤稀释板及Liofilchem所有产品（鉴定和AST）的结果（Terramo，Italy；www.biomic.com）。Fader等在关于MicroScan鉴定板在BIOMIC仪上读数的多实验室研究中发现，相较于MicroScan Walk-Away读数，对846株革兰阴性菌的BIOMIC判读总体一致性为99.5%，对430株革兰阳性菌为99.5%[32]。

（九）手工试剂盒、分析物和非自动化平台

一系列手工试剂盒、分析物和非自动化平台可用于鉴定多种常见和罕见病原菌。在许多情况下，它们作为自动化系统的补充，鉴定那些无法在自动化系统中充分生长的苛养菌，或在自动化系统检测异常或失败时作为备选方法。这些检测的原理是基于微生物在底物存在时生长所产生的浊度变化。表5-4包含了较常用的根据其鉴定微生种群分级检测方法，建议有兴趣的读者联系制造商获取其最新的应用和性能信息。

表 5-4 截至 2018 年 1 月，非自动化鉴定系统进行细菌鉴定的总结[a]

鉴定系统	公司名称	鉴别微生物	存储温度(℃)	测试数量	孵化时间(h)[b]
厌氧菌鉴定系统					
API 20A	bioMérieux	厌氧菌	2～8	21	24～48，厌氧
Rapid ID 32A	bioMérieux	厌氧菌	2～8	29	4，有氧
BBL CrystalAnaerobe	BD	厌氧菌	2～8	29	4，有氧[c]
RapID ANA Ⅱ	Thermo Fisher Scientific (Remel)	厌氧菌	2～8	18	4～6，有氧
肠杆菌和革兰阴性杆菌鉴定系统					
API 20E	bioMérieux	肠杆菌科和革兰阴性非发酵肠杆菌等	2～8	21	18～24
API Rapid 20E	bioMérieux	肠杆菌科	2～8	20	4
API 20NE	bioMérieux	非肠杆菌科	2～8	20	24～48
API NH	bioMérieux	奈瑟菌属、嗜血杆菌、卡他莫拉菌	2～8	12	2
API Campy	bioMérieux	弯曲杆菌	2～8	20	24，有氧(CO_2)
ID 32 E	bioMérieux	革兰阴性杆菌	2～8	32	24
BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID	BD Diagnostics	肠杆菌科细菌、某些革兰阴性非发酵菌	2～25	30	18～20
BBL CrystalNeiseria/Haemophilus ID kit	BD Diagnostics	奈瑟菌、流感嗜血杆菌、其他苛养菌	2～8	29	4
BBL Enterotube Ⅱ	BD Diagnostics	肠杆菌科、氧化酶阴性革兰阴性杆菌	2～8	15	18～24
Microbact 12A，12E[d]	Oxoid	肠杆菌科、各种革兰阴性杆菌	2～8	12	18～48
Microbact 12B[d]	Oxoid	补充 12A 用于鉴定其他革兰阴性杆菌	2～8	12	24～48
Microbact 24E[d]	Oxoid	肠杆菌科和其他革兰阴性杆菌	2～8	24	24～48
RapID NF Plus	Thermo Fisher Scientific (Remel)	非发酵和某些特定发酵革兰阴性杆菌(不包括肠杆菌)	2～8	17	4
RapID NH Plus	Thermo Fisher Scientific (Remel)	奈瑟菌、嗜血杆菌、卡他莫拉菌	2～8	13	4 1(生长于选择培养琼脂上的淋病奈瑟菌)
RapID ONE	Thermo Fisher Scientific (Remel)	肠杆菌科和其他特定氧化酶阴性革兰阴性杆菌	2～8	19	4
革兰阳性球菌鉴定系统					
API Staph	bioMérieux	葡萄球菌、微球菌	2～8	20	18～24
ID 32 Staph	bioMérieux	葡萄球菌	2～8	32	24
API 20 Strep	bioMérieux	链球菌和肠球菌	2～8	20	4～24
Rapid ID 32 STREP	bioMérieux	链球菌	2～8	32	4
BBL Crystal Gram-positive ID kit	BD Diagnostics	革兰阳性菌	2～8	29	18～24

（续 表）

鉴定系统	公司名称	鉴别微生物	存储温度（℃）	测试数量	孵化时间(h)[b]
BBL Crystal Rapid Gram-positive ID kit	BD Diagnostics	革兰阳性菌	2～8	29	4
RapID Staph Plus	Thermo Fisher Scientific (Remel)	葡萄球菌和相关革兰阳性球菌	2～8	18	4
RapID STR	Thermo Fisher Scientific (Remel)	链球菌和其他革兰阳性球菌	2～8	14	4
Microbact Staph 12S	Thermo Fisher Scientific (Oxoid)	葡萄球菌	2～8	12	24
革兰阳性杆菌鉴定系统					
API Coryne	bioMérieux	棒状杆菌及其类生物	2～8	20	24
API Listeria	bioMérieux	李斯特菌	2～8	20	24
RapID CB Plus	Thermo Fisher Scientific (Remel)	棒状杆菌(52 种分类)	2～8	18	4～6
Microbact Listeria 12L	Thermo Fisher Scientific (Oxoid)	李斯特菌	2～8	12	4;18～24[e]
酵母菌鉴定系统					
RapID Yeast Plus	Thermo Fisher Scientific (Remel)	医学上重要的酵母和类酵母微生物(41 种分类)	2～8	18	4,30℃
API 20C AUX	bioMérieux	酵母菌	2～8	19	48～72,30℃
ID 32 C	bioMérieux	酵母菌(63 种分类)	2～8	32	24～48,30℃
AuxaColor	BioRad	酵母菌(32 种分类)	2～8	16	48～72,30℃
联合检测系统					
RapID SS/u	Thermo Fisher Scientific (Remel)	从尿中分离的常见革兰阳性和革兰阴性细菌和酵母菌	2～8	12	2

注：[a] 编辑整理于：http://www.bd.com/ds/productCenter/IS.asp；http://www.biomerieux-usa.com/；http://www.thermofisher.com/us/en/home.html；[b] 除非另有说明，否则在有氧条件下 35～37℃孵育；[c] 需要 40%～60%的湿度；[d] 12A 和 12B 是板条式；12E 和 24E 是微孔板式；[e] 孵育时间取决于接种量，相当于 0.5 麦氏浊度的接种物可在 4 h 读数，对单个菌落进行测试时，需要更长的孵育时间

三、蛋白质组学鉴定系统：MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS 提供了快速且廉价的细菌和真菌鉴定方法，其待检物可取自包括显色培养基在内的多种实验室培养基上的菌落[33-34]。MALDI 是指基质辅助细菌和真菌蛋白质从激光获得能量而解吸和电离[35]。虽然菌体蛋白质可以提取出，但最佳方法是直接(使用塑料或木质牙签棒、环或加样枪头等)将细菌或真菌菌落移至 MALDI-TOF MS 点样靶板上(一次性或可重复使用的带有点样靶点的靶板)(图 5-1)。用基质液覆盖(或先用甲酸溶液覆盖，干燥后加基质液)靶点，干燥后，再将靶板放置于质谱仪中(图 5-2)。基质液(例如，溶解在 50%乙腈和 2.5%氟乙酸中的 α-氰基-4-羟基肉桂酸)将细菌或真菌分子彼此分离，并保护它们免被破碎肽解并确保它们能被激光能量解吸；基质吸收绝大部分激光能量，转化成离子状态。由于在气相中的分子间的随机碰撞，电荷可以从基质转移到微生物分子上，离子化的微生物分子在正电荷静电场加速后，进入时间飞行管(TOF 管)中。在真空的 TOF 管内，离子化的分子向离子探测器方向运动，质量小的分析物飞行速度最快，其次是质量渐大的分析物，从而产生出质谱数据，它代表特定质量离子依时间撞击探测器的数量。质谱通常是由高度富集的(主要是核糖体)蛋白质产生。虽然它们个体谱峰没有特征性，但组合起来的谱峰可以产生单种微生物的独特谱型，谱型的峰值具有种属特异性。计算

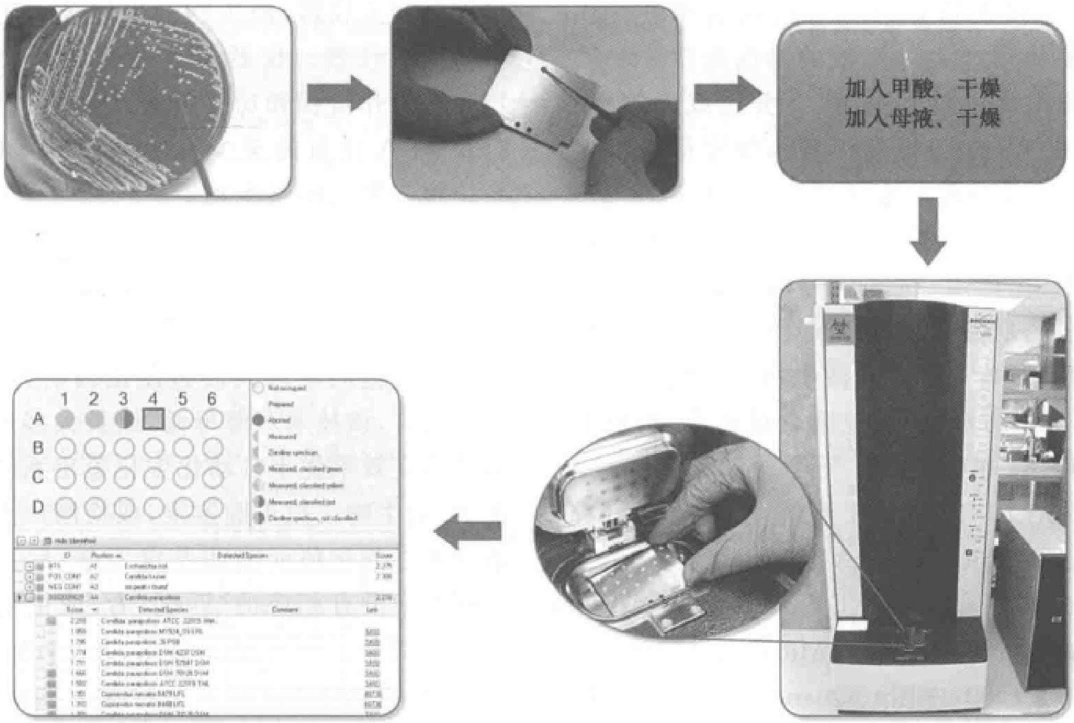


图 5-1 MALDI-TOF MS 工作流程(摘自参考文献[35])

注:将培养板中的克隆菌株置于 MALDI-TOF MS 靶板的 Spot 靶点(带有多个测试点的可重复使用或一次性使用的靶板)中。一次可检测 1 个或多个菌株。本例为在 Mayo Clinic (Rochester,MN)所使用的 Bruker 系统[35],用甲酸处理靶标板上的细胞,然后滴加 1~2 μl 基质干燥后,将靶标板置于质谱仪中进行检测分析(图 5-2)。软件将产生的质谱数据与系统数据库进行比对,进行微生物的鉴别(本图中 A4 位置所示为 Candida parapsilosis 菌)。本图相关数据经授权引自梅奥医学教育和研究基金会,版权归其所有,见彩插

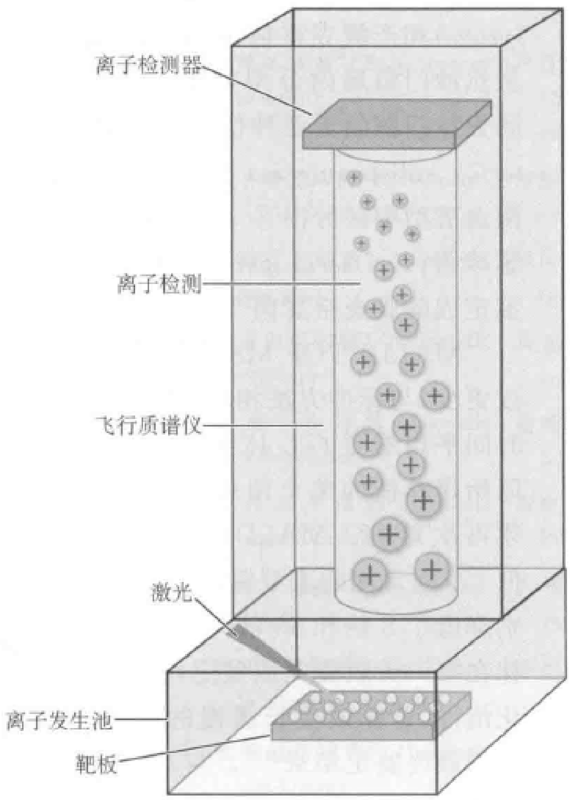


图 5-2 MALDI-TOF MS(摘自参考文献[35])

注:靶板放置于质谱仪中后由激光枪发射激光照射 Spot 靶点,解吸其中的微生物和基质分子。电荷从基质转移至微生物分子上,离子化的分子在正电静电场中加速后,再进入真空时间飞行管(TOF 管)或质量分析管中,离子化的分子向离子探测器方向运动,质量小的测试物的飞行的速度最快,其次是质量渐大的测试物,当离子从质量分析管飞向离子检测器的过程会产生出质谱数据,它代表特定质量离子依时间撞击探测器的数量。尽管物质的分离是根据质量-电荷比来区分的,由于在此应用中电荷基本上是单一的,所以物质的分离最终取决于分子量的大小。本图相关数据经授权引自梅奥医学教育和研究基金会,版权归其所有,见彩插

算机软件将生成的质谱与参考谱数据库进行比对，通过数值排列产生一组依关系远近排序的数值列表；根据最高匹配项的值（百分比或分数）的高低（并考虑下一个最佳匹配项），鉴定待检微生物在科、属、种或亚种的水平。MALDI-TOF MS的检测结果通常可具重现性，并可较好地耐受测试环境、仪器、操作者、试剂批号和样品位置的变化，但质谱图的质量可能会受点样靶上的生物量和涂片均匀度影响[36-37]。其微生物样本的制备通常包括以下3种方法：菌落克隆直接转涂、靶板上甲酸处理和乙醇-甲酸提取。

市售MALDI-TOF MS系统主要有Bruker Daltonics公司（Billerica，MA）和bioMérieux（生物梅里埃）公司（Durham，NC）。另有其他系统，包括Andromas（法国巴黎）、Microtyper MS（中国）、Autof ms 1000（中国）、Quant TOF（中国）和Clin-TOF（中国）等，在此不做深入讨论。Bruker Biotyper系统包括一台质谱仪、软件和数据库。获得FDA许可的系统称为MALDI Biotyper CA。Bruker还拥有仅供研究使用（research use only，RUO）的数据库（2017 RUO数据库版本包括7，311个质谱图）和包括丝状真菌库、分枝杆菌库和“安保相关”数据库在内的其他RUO数据库。2010年，生物梅里埃公司收购了AnagnosTec公司（Zossen，Germany）销售的谱库和微生物鉴定系统（SARAMIS）的微生物数据库并用于岛津AXIMA Assurance质谱仪（Shimadzu，Columbia，MD），并更名为VITEK MS RUO，继而开发了新的数据库、软件和算法，称为VITEK MS IVD（包括预发布版本的VITEK MS v1.1数据库、v1系统/v1.1数据库、v2.0系统/v2.0数据库和算法及v3.0系统/v3.0数据库和算法）。已获FDA许可的系统称为VITEK MS。VITEK MS Plus结合了VITEK MS和SARAMIS（当前为v4.14）数据库。Bruker系统与生物梅里埃系统在数据库、鉴定算法和仪器构造都不相同；报告结果的数值等级依据的运算范围不同，没有直接可比性；但在大多数比较研究中，两者检测性能相当，推测其数据库包括了所研究的特定种[38-40]。值得注意的是，质谱数据库随时间迭代更新，因此，研究者应谨慎地在其出版物中注明所使用的数据库版本（例如，用于Bruker RUO数据库的MSP数量）。Bruker的Microflex LT质谱仪是台式仪器，而生物梅里埃公司生产的是大型落地式仪器。仪器系统的选择取决于实验室特定的工作流程和功能需求。表5-5列出了目前已获FDA许可的至少有1种MALDI-TOF MS系统报告鉴定的微生物。

由于不同的标本制备、微生物检测设置（例如，是否丰富了罕见微生物的鉴定）、参考鉴定方法、质谱仪、软件、解释指南和数据库这2个系统中迅速实施的渐进式改进使比较研究变得困难。总体而言，该技术对酵母菌，以及大多数需氧和厌氧菌鉴定效果优于自动化生化鉴定系统。通常情况下，微生物或被正确鉴定，或检测产生一个低分值或低百分比值而表明鉴定不佳；后者通常提示数据库中没有相应的“匹配”者，或由前期样本操作不当引起。但有研究显示，与Bruker Biotyper相比，当数据库中不存在待检微生物时Vitek MS的错误鉴定报告更多[40]。MALDI-TOF MS可以鉴定以前须通过16S rRNA基因测序才能鉴定的大部分细菌[41]，错误鉴定可发生于密切相关的微生物间，但通常能发现，如大肠埃希菌和志贺菌属总是不能很好地被区分开。一般来说，阴沟肠杆菌复合群可以通过MALDI-TOF MS准确鉴定出来，尽管在该复合物中存在一些可能无法被辨别的菌种[42-43]。植生拉乌尔菌（*Raoultella planticola*）、解鸟氨酸拉乌尔菌（*Raoultella ornithinolytica*）和产酸克雷伯菌的质谱可能较为相似[44]。虽然沙门菌属内分型鉴定通常不可行，但它可将肠炎沙门菌肠炎亚种伤寒血清型（*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi）从其他沙门菌血清型中区分出[45]。在Bruker系统中，多糖奈瑟球菌（*Neisseria polysaccharea*）可能会被错误鉴定成脑膜炎奈瑟菌[46]。

MALDI-TOF MS的周转时间为每株3 min或更少，与标准方法相比，细菌和真菌鉴定的周转时间平均缩短了1.45天[47]。因为仅需少量菌量，原始培养板的单个菌落可以直接用于鉴定，而无须再次培养。MALDI-TOF MS所用试剂成本低[47]，同常规的表型鉴定和测序法相比，其成本分别降低了5倍和96倍[41]。据估计，87%的分离菌株在第一天就能完成鉴定（标准方法为9%），对生化惰性、苛养或生长缓慢的微生物可以提前数天拿到最终鉴定结果[47]。与基于生化反应鉴定方法相比，其产生废物垃圾的重量可减少6倍[48]。多

表 5-5 FDA 许可的 Vitek MS 和 MALDI Biotyper CA 系统可报告微生物清单[a]

需氧型革兰阳性细菌			
缺陷乏养菌(*Abiotrophia defectiva*)	溃疡棒杆菌[B](Corynebacterium ulcerans)	乳酸片球菌(Pediococcus acidilactici)	咽峡炎链球菌(Streptococcus anginosus)
栖血气球菌[B](*Aerococcus sanguinicola*)	解脲棒杆菌[B](Corynebacterium urealyticum)	戊糖片球菌[B](Pediococcus pentosaceus)	犬链球菌[B](Streptococcus canis)
尿气球菌[B](*Aerococcus urinae*)	干燥棒杆菌[B](Corynebacterium xerosis)	龋齿罗氏菌[B](Rothia dentocariosa)	马链球菌[B](Streptococcus equi)
浅绿气球菌(*Aerococcus viridans*)	人皮杆菌[B](Dermabacter hominis)	黏滑罗氏菌[B](Rothia mucilaginosa)	星座链球菌(Streptococcus constellatus)
耳炎差异球菌[B](*Alloiococcus otitis*)	西宫皮生球菌[B](Dermacoccus nishinomiyaensis)	气罗斯菌[B](Rothia aeria)	停乳链球菌[B](Streptococcus dysgalactiae)
卡氏节杆菌[B](*Arthrobacter cumminsii*)	鸟肠球菌(Enterococcus avium)	耳葡萄球菌[B](Staphylococcus auricularis)	停乳链球菌停乳亚种[V](Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae)
乳酪短杆菌[B](*Brevibacterium casei*)	铅黄肠球菌(Enterococcus casseliflavus)	金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)	停乳链球菌似马亚种[V](Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis)
拥挤棒杆菌[B](*Corynebacterium accolens*)	坚韧肠球菌(Enterococcus durans)	头葡萄球菌(Staphylococcus capitis)	解没食子链球菌解没食子亚种[V](Streptococcus gallolyticus subsp. gallolyticus)
非发酵棒杆菌群[B](Corynebacterium afermentans group)	粪肠球菌(Enterococcus faecalis)	山羊葡萄球菌[B](Staphylococcus caprae)	解没食子链球菌[B](Streptococcus gallolyticus)
无枝菌酸棒杆菌[B](Corynebacterium amycolatum)	屎肠球菌(Enterococcus faecium)	肉葡萄球菌[B](Staphylococcus carnosus)	戈登链球菌[B](Streptococcus gordonii)
金色黏液棒杆菌群[B](Corynebacterium aurimucosum)	鹑鸡肠球菌(Enterococcus gallinarum)	科氏葡萄球菌[B](Staphylococcus cohnii)	小儿链球菌大肠亚种[V](Streptococcus infantarius subsp. coli)
牛棒状杆菌[B](Corynebacterium bovis)	小肠肠球菌[B](Enterococcus hirae)	科氏葡萄球菌科氏亚种[V](Staphylococcus cohnii subsp. Cohnii)	小儿链球菌小儿亚种[V](Streptococcus infantarius subsp. infantarius)
科伊尔棒杆菌[B](Corynebacterium coyleae)	蒙特肠球菌[B](Enterococcus mundtii)	科氏葡萄球菌解脲亚种[V](Staphylococcus cohnii subsp. Urealyticus)	中间型链球菌[B](Streptococcus intermedius)
白喉棒杆菌[B](Corynebacterium diphtheriae)	棉子糖肠球菌[B](Enterococcus raffinosus)	海豚葡萄球菌[B](Staphylococcus delphini)	Streptococcus lutetiensis[B]
弗雷尼棒杆菌[B](Corynebacterium freneyi)	人费克蓝姆菌[B](Facklamia hominis)	表皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermidis)	缓症链球菌/口腔链球菌[V](Streptococcus mitis/Streptococcusoralis)
解谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glucuronolyticum)	阴道加德纳菌(Gardnerella vaginalis)	马葡萄球菌[B](Staphylococcus equorum)	缓症链球菌/口腔链球菌群[B](Streptococcus mitis/oralis group)
谷氨酸棒杆菌[B](Corynebacterium glutamicum)	溶血孪生球菌(Gemella haemolysans)	猫葡萄球菌[B](Staphylococcus felis)	变异链球菌(Streptococcus mutans)
杰氏棒杆菌(Corynebacterium jeikeium)	麻疹孪生球菌(Gemella morbillorum)	溶血葡萄球菌(Staphylococcus haemolyticus)	副血链球菌[B](Streptococcus parasanguinis)
克氏棒杆菌[B](Corynebacterium kroppenstedtii)	血孪生球菌[B](Gemella sanguinis)	人葡萄球菌(Staphylococcus hominis)	肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)
麦氏棒杆菌[B](Corynebacterium macginleyi)	毗邻颗粒链菌(Granulicatella adiacens)	中间葡萄球菌[B](Staphylococcus intermedius)	化脓链球菌(Streptococcus Pyogenes)
极小棒杆菌[B](Corynebacterium minutissimum)	孔兹创伤球菌[B](Helcococcus kunzii)	缓慢葡萄球菌[B](Staphylococcus lentus)	唾液链球菌/前庭链球菌群[B](Streptococcus salivarius/vestibularis group)

（续 表）

需氧型革兰阳性细菌			
产黏棒杆菌/快速解脲棒杆菌群[B](Corynebacterium mucifaciens/ureicelerivorans group)	克氏库克菌[B](Kocuria kristinae)	路邓葡萄球菌(Staphylococcus lugdunensis)	唾液链球菌唾液亚种[V](Streptococcus salivarius subsp. salivarius)
丙酸棒杆菌[B](Corynebacterium propinquum)	久坐皮肤球菌[B](Kytococcus sedentarius)	巴斯德葡萄球菌[B](Staphylococcus pasteuri)	血链球菌(Streptococcus sanguinis)
假白喉棒杆菌[B](Corynebacterium pseudodiphtheriticum)	詹氏乳杆菌[B](Lactobacillus jensenii)	佩滕科夫葡萄球菌[B](Staphylococcus pettenkoferi)	表兄链球菌[B](Streptococcus sobrinus)
假结核棒杆菌[B](Corynebacterium pseudotuberculosis)	鼠李糖乳杆菌[B](Lactobacillus rhamnosus)	假中间葡萄球菌[B](Staphylococcus pseudintermedius)	嗜热链球菌[B](Streptococcus thermophilus)
多耐棒杆菌[B](Corynebacterium resistens)	加氏乳球菌(Lactococcus garvieae)	解糖葡萄球菌[B](Staphylococcus saccharolyticus)	伯纳德储珀菌[B](Trueperella bernardiae)
里格尔棒杆菌[B](Corynebacterium riegelii)	加氏乳杆菌[B](Lactobacillus gasseri)	腐生葡萄球菌(Staphylococcus saprophyticus)	耳炎苏黎世菌[B](Turicella otitidis)
纹带棒杆菌群[B](Corynebacterium striatum group)	乳酸乳球菌(Lactococcus lactis)	施氏葡萄球菌(Staphylococcus schleiferi)	河流漫游球菌[B](Vagococcus fluvialis)
结核硬脂酸棒杆菌[B](Corynebacterium tuberculostearicum)	柠檬明串珠菌[B](Leuconostoc citreum)	松鼠葡萄球菌(Staphylococcus sciuri)	
	肠膜样明串珠菌(Leuconostoc mesenteroides)	猴葡萄球菌(Staphylococcus simulans)	
	假肠膜明串珠菌(Leuconostoc pseudomesenteroides)	小牛葡萄球菌[B](Staphylococcus vitulinus)	
	单核细胞增生李斯特菌(Listeria monocytogenes)	沃氏葡萄球菌(Staphylococcus warneri)	
	解酪巨型球菌[B](Macrococcus caseolyticus)	木糖葡萄球菌[B](Staphylococcus xylosus)	
	藤黄微球菌(Micrococcus luteus)	无乳链球菌(Streptococcus agalactiae)	
	里拉微球菌[B](Micrococcus lylae)		
革兰阴性细菌、肠杆菌科			
无丙二酸柠檬酸杆菌[V](Citrobacter amalonaticus)	阿氏肠杆菌[V](Enterobacter asburiae)	肺炎克雷伯菌(Klebsiella pneumoniae)	沙门菌群[V](Salmonella group)
无丙二酸柠檬酸杆菌复合菌[B](Citrobacter amalonaticus complex)	生癌肠杆菌[V](Enterobacter cancerogenus)	异栖克雷伯菌[B](Klebsiella variicola)	沙门菌属[B](Salmonella sp)
布氏柠檬酸杆菌[V](Citrobacter braakii)	阴沟肠杆菌[V](Enterobacter cloacae)	非脱羧勒克菌(Leclercia adecarboxylata)	居泉沙雷菌(Serratia fonticola)
弗劳地柠檬酸杆菌[V](Citrobacter freundii)	阴沟肠杆菌复合菌[B](Enterobacter cloacae complex)	摩氏摩根菌(Morganella morganii)	液化沙雷菌(Serratia liquefaciens)
弗劳地柠檬酸杆菌复合菌[B](Citrobacter freundii complex)	日勾维多源杆菌(Pluralibacter gergoviae)	成团泛菌(Pantoea agglomerans)	黏质沙雷菌(Serratia marcescens)
克氏柠檬酸杆菌(Citrobacter koseri)	大肠埃希菌(Escherichia coli)	类志贺邻单胞菌[B](Plesiomonas shigelloides)	气味沙雷菌(Serratia odorifera)

（续　表）

革兰阴性细菌、肠杆菌科			
杨氏柠檬酸杆菌^{V}(Citrobacter youngae)	弗格森埃希菌^{V}(Escherichia fergusonii)	奇异变形菌(Proteus mirabilis)	普利茅斯沙雷菌^{B}(Serratia plymuthica)
阪崎克洛诺杆菌^{V}(Cronobacter sakazakii)	赫氏埃希菌(Escherichia hermannii)	潘氏变形菌^{V}(Proteus penneri)	深红沙雷菌^{B}(Serratia rubidaea)
阪崎克洛诺杆菌群^{B}(Cronobacter sakazakii group)	伤口埃希菌^{B}(Escherichia vulneris)	普通变形杆菌^{V}(Proteus vulgaris)	小肠结肠炎耶尔森菌(Yersinia enterocolitica)
保科爱德华菌^{V}(Edwardsiella hoshinae)	美洲尤因(爱文)菌(Ewingella americana)	普通变形杆菌群^{B}(Proteus vulgaris group)	弗氏耶尔森菌(Yersinia frederiksenii)
迟钝爱德华菌(Edwardsiella tarda)	蜂房哈夫尼亚菌(Hafnia alvei)	雷氏普罗威登斯菌(Providencia rettgeri)	中间耶尔森菌(Yersinia intermedia)
产气肠杆菌(Enterobacter aerogenes)	产酸克雷伯菌^{V}(Klebsiella oxytoca)	斯氏普罗威登斯菌(Providencia stuartii)	克氏耶尔森菌(Yersinia kristensenii)
河生肠杆菌^{B}(Enterobacter amnigenus)	产酸克雷伯菌/解鸟氨酸拉乌尔菌^{B}(Klebsiella oxytoca/Raoultella ornithinolytica)	解鸟氨酸拉乌尔菌^{V}(Raoultella ornithinolytica)	假结核耶尔森菌()Yersinia pseudotuberculosis
		植生拉乌尔菌^{V}(Raoultella planticola)	
革兰阴性细菌、非肠杆菌科			
脱硝化无色杆菌^{V}(Achromobacter denitrificans)	温和气单胞菌^{V}(Aeromonas sobria)	产吲哚金黄杆菌(Chryseobacterium indologenes)	恶臭假单胞菌^{V}(Pseudomonas putida)
木糖氧化无色杆菌(Achromobacter xylosoxidans)	气单胞菌属^{B}(Aeromonas spp)	少见贪铜菌群^{B}(Cupriavidus pauculus group)	恶臭假单胞菌群^{B}(Pseudomonas putida group)
鲍曼不动杆菌复合菌^{V}(Acinetobacter baumannii complex)	粪产碱杆菌^{B}(Alcaligenes faecalis)	食酸代尔夫特菌群^{B}(Delftia acidovorans group)	施氏假单胞菌(Pseudomonas stutzeri)
鲍曼不动杆菌/医院不动杆菌群^{B}(Acinetobacter baumannii/nosocomialis group)	粪产碱杆菌粪亚种^{V}(Alcaligenes faecalis subsp. faecalis)	脑膜脓毒伊丽莎白菌^{V}(Elizabethkingia meningoseptica)	皮氏罗尔斯顿菌(Ralstonia pickettii)
醋酸钙不动杆菌^{B}(Acinetobacter calcoaceticus)	鲍特菌群^{B}(Bordetella group)	脑膜脓毒伊丽莎白菌群^{B}(Elizabethkingia meningoseptica group)	放射根瘤菌(Rhizobium radiobacter)
溶血不动杆菌(Acinetobacter haemolyticus)	欣氏鲍特菌^{B}(Bordetella hinzii)	Fluoribacter bozemanii^{B}	多食鞘氨醇杆菌(Sphingobacterium multivorum)
约翰逊不动杆菌^{B}(Acinetobacter johnsonii)	副百日咳鲍特菌^{V}(Bordetella parapertussis)	溶血曼海姆菌群^{B}(Mannheimia haemolytica group)	食醇鞘氨醇杆菌(Sphingobacterium spiritivorum)
琼氏不动杆菌(Acinetobacter junii)	百日咳鲍特菌^{V}(Bordetella pertussis)	拟香味类香味菌^{B}(Myroides odoratimimus)	少动鞘氨醇单胞菌^{V}(Sphingomonas paucimobilis)
洛菲不动杆菌(Acinetobacter lwoffii)	缺陷短波单胞菌^{V}(Brevundimonas diminuta)	类香味菌^{B}(Myroides odoratus)	少动鞘氨醇单胞菌群^{B}(Sphingomonas paucimobilis group)
皮特不动杆菌^{B}(Acinetobacter pittii)	缺陷短波单胞菌群^{B}(Brevundimonas diminuta group)	人苍白杆菌(Ochrobactrum anthropi)	嗜麦芽窄食单胞菌(Stenotrophomonas maltophilia)
抗辐射不动杆菌^{B}(Acinetobacter radioresistens)	洋葱伯克霍尔德菌复合群^{B}(Burkholderia cepacia complex)	多杀巴斯德菌(Pasteurella multocida)	沃兹沃思萨特菌^{B}(Sutterella wadsworthensis)

(续 表)

革兰阴性细菌、非肠杆菌科			
乌尔新不动杆菌[B](Acinetobacter ursingii)	唐菖蒲伯克霍尔德菌[B](Burkholderia gladioli)	铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)	霍乱弧菌[V](Vibrio cholerae)
嗜水/豚鼠气单胞菌[V](Aeromonas hydrophila/caviae)	多食伯克霍尔德菌(Burkholderia multivorans)	荧光假单胞菌[V](Pseudomonas fluorescens)	副溶血弧菌(Vibrio parahaemolyticus)
杀鲑气单胞菌[B](Aeromonas salmonicida)	黄褐二氧化碳嗜纤维菌[B](Capnocytophaga ochracea)	荧光假单胞菌群[B](Pseudomonas fluorescens group)	创伤弧菌(Vibrio vulnificus)
	生痰二氧化碳嗜纤维菌[B](Capnocytophaga sputigena)	栖稻假单胞菌[B](Pseudomonas oryzihabitans)	有毒威克斯菌[B](Weeksella virosa)
	黏金黄杆菌[B](Chryseobacterium gleum)		
革兰阴性苛养菌			
伴放线凝聚杆菌(Actinobacillus actinomycetemcomitans)	流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae)	卡他莫拉菌[B](Moraxella catarrhalis)	淋病奈瑟球菌(Neisseria gonorrhoeae)
嗜沫凝聚杆菌(Aggregatibacter aphrophilus)	副溶血嗜血杆菌[V](Haemophilus parahaemolyticus)	绵羊莫拉菌(奈瑟)[V](Moraxella(Neisseria) ovis)	乳糖奈瑟球菌[B](Neisseria lactamica)
惰性凝聚杆菌(Aggregatibacter segnis)	副溶血嗜血杆菌群[B](Haemophilus parahaemolyticus group)	非液化莫拉菌[B](Moraxella nonliquefaciens)	脑膜炎奈瑟球菌(Neisseria meningitidis)
大肠弯曲菌(Campylobacter coli)	副流感嗜血杆菌(Haemophilus parainfluenzae)	奥斯陆莫拉菌[B](Moraxella osloensis)	黏膜/干燥奈瑟球菌[V](Neisseria mucosa/sicca)
空肠弯曲菌(Campylobacter jejuni)	脱氮金氏菌(Kingella denitrificans)	杆状奈瑟菌[B](Neisseria bacilliformis)	干燥奈瑟球菌群[B](Neisseria sicca group)
解脲弯曲菌[B](Campylobacter urealyticus)	金氏金氏菌(Kingella kingae)	灰色奈瑟菌(Neisseria cinerea)	编织奈瑟菌[B](Neisseria weaveri)
侵蚀艾肯菌(Eikenella corrodens)	长滩军团菌[B](Legionella longbeachae)	长奈瑟球菌[B](Neisseria elongata)	解脲寡源杆菌(Oligella ureolytica)
溶血嗜血杆菌[B](Haemophilus haemolyticus)	嗜肺军团菌(Legionella pneumophila)	黄/微黄奈瑟球菌群[B](Neisseria flavescens/subflava group)	尿道寡源杆菌(Oligella urethralis)
厌氧菌			
欧洲放线菌[B](Actinomyces europaeus)	卵形/溶木聚糖拟杆菌[V](Bacteroides ovatus/xylanisolvens)	梭状梭菌[V](Clostridium clostridioforme)	约氏副拟杆菌/粪副拟杆菌群[B](Parabacteroides johnsonii/merdae group)
芬克放线菌[B](Actinomyces funkei)	卵形拟杆菌群[B](Bacteroides ovatus group)	艰难梭菌(Clostridium difficile)	古氏副拟杆菌[B](Parabacteroides goldsteinii)
格雷文尼放线菌[B](Actinomyces graevenitzii)	化脓拟杆菌[B](Bacteroides pyogenes)	无害梭菌[B](Clostridium innocuum)	微小微单胞菌(Parvimonas micra)
猪阴道放线菌[B](Actinomyces hyovaginalis)	萨耶斯拟杆菌[B](Bacteroides salyersiae)	副腐败梭菌[B](Clostridium paraputrificum)	不解糖嗜胨菌[V](Peptoniphilus asaccharolyticus)
麦尔放线菌(Actinomyces meyeri)	粪便拟杆菌群[B](Bacteroides stercoris group)	产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)	黑尔嗜胨菌群[B](Peptoniphilus harei group)
纽氏放线菌(Actinomyces neuii)	多形拟杆菌[B](Bacteroides thetaiotaomicron)	多枝梭菌(Clostridium ramosum)	厌氧消化链球菌(Peptostreptococcus anaerobius)
龋齿放线菌(Actinomyces odontolyticus)	多形拟杆菌群[B](Bacteroides thetaiotaomicron group)	败毒梭菌[B](Clostridium septicum)	牙龈卟啉单胞菌[B](Porphyromonas gingivalis)

（续 表）

厌氧菌			
雷丁放线菌[B]（Actinomyces radingae）	单形拟杆菌（Bacteroides uniformis）	索氏梭菌[B]（Clostridium sordellii）	索氏卟啉单胞菌[B]（Porphyromonas somerae）
苏黎世放线菌[B]（Actinomyces turicensis）	普通拟杆菌[V]（Bacteroides vulgatus）	产胞梭菌/肉毒梭菌（Ⅰ群）[B]［Clostridium sporogenes/Clostridium botulinum(group Ⅰ)］	二路普雷沃菌（Prevotella bivia）
泌尿生殖道放线菌[B]（Actinomyces urogenitalis）	普通拟杆菌群[B]（Bacteroides vulgatus group）	第三梭菌[B]（Clostridium tertium）	颊普雷沃菌（Prevotella buccae）
口腔放线菌[B]（Actinomyces oris）	短双歧杆菌[B]（Bifidobacterium breve）	大芬戈尔德菌（Finegoldia magna）	栖牙普雷沃菌（Prevotella denticola）
斯氏放线棒菌群[B]（Actinotignum schaalii group）	贝杰林克梭菌[B]（Clostridium beijerinckii）	猫狗梭杆菌[B]（Fusobacterium canifelinum）	中间普雷沃菌（Prevotella intermedia）
广栖异斯卡多维菌[B]（Alloscardovia omnicolens）	双酶梭菌[B]（Clostridium bifermentans）	坏死梭杆菌（Fusobacterium necrophorum）	产黑色普雷沃菌（Prevotella melaninogenica）
默多克厌氧球菌[B]（Anaerococcus murdochii）	丁酸梭菌[B]（Clostridium butyricum）	具核梭杆菌（Fusobacterium nucleatum）	痤疮丙酸杆菌（Propionibacterium acnes）
阴道厌氧球菌[B]（Anaerococcus vaginalis）	梭形梭菌群[B]（Clostridium clostridioforme group）	柯氏动弯杆菌（Mobiluncus curtisii）	小韦荣球菌群[B]（Veillonella parvula group）
粪拟杆菌（Bacteroides caccae）		吉氏副拟杆菌[B]（Parabacteroides distasonis）	
脆弱拟杆菌（Bacteroides fragilis）			
诺德拟杆菌[B]（Bacteroides nordii）			
分枝杆菌和诺卡菌属			
脓肿分枝杆菌[V]（Mycobacterium abscessus）	慢生黄分枝杆菌[V]（Mycobacterium lentiflavum）	结核分枝杆菌复合群[V]（Mycobacterium tuberculosis complex）	皮疽诺卡菌[V]（Nocardia farcinica）
鸟分枝杆菌[V]（Mycobacterium avium）	玛尔摩分枝杆菌[V]（Mycobacterium malmoense）	蟾蜍分枝杆菌[V]（Mycobacterium xenopi）	皮疽诺卡菌群[B]（Nocardia farcinica group）
龟分枝杆菌[V]（Mycobacterium chelonae）	海分枝杆菌[V]（Mycobacterium marinum）	脓肿诺卡菌[V]（Nocardia abscessus）	豚鼠耳炎诺卡菌（Nocardia otitidiscaviarum）
偶发分枝杆菌群[V]（Mycobacterium fortuitum group）	产黏液分枝杆菌[V]（Mycobacterium mucogenicum）	新诺卡菌（Nocardia nova）	寡食诺卡菌[V]（Nocardia paucivorans）
戈登分枝杆菌[V]（Mycobacterium gordonae）	瘰疬分枝杆菌[V]（Mycobacterium scrofulaceum）	星形诺卡菌[V]（Nocardia asteroides）	假巴西诺卡菌[V]（Nocardia pseudobrasiliensis）
嗜血分枝杆菌[V]（Mycobacterium haemophilum）	猿猴分枝杆菌[V]（Mycobacterium simiae）	巴西诺卡菌（Nocardia brasiliensis）	德兰士瓦诺卡菌[V]（Nocardia transvalensis）
免疫应答分枝杆菌[V]（Mycobacterium immunogenum）	耻垢分枝杆菌[V]（Mycobacterium smegmatis）	圣乔治诺卡菌（Nocardia cyriacigeorgica）	老兵诺卡菌[V]（Nocardia veterana）
胞内分枝杆菌[V]（Mycobacterium intracellulare）	苏加分枝杆菌[V]（Mycobacterium szulgai）		华莱士诺卡菌[V]（Nocardia wallacei）
堪萨斯分枝杆菌[V]（Mycobacterium kansasii）			
酵母菌			
白念珠菌（Candida albicans）	郎比可念珠菌（Candida lambica）	产朊念珠菌/Cyberlindnera jadinii（Candida utilis/Cyberlindnera jadinii）	头状地丝菌（Geotrichum capitatum）

（续 表）

酵母菌			
博伊丁念珠菌[B]（Candida boidinii）	解脂念珠菌（Candida lipolytica）	Candida valida[B]	Kloeckera apiculata
都柏林念珠菌（Candida dubliniensis）	葡萄牙念珠菌（Candida lusitaniae）	涎沫念珠菌（Candida zeylanoides）	奥默柯达菌/毕赤酵母（Kodamaea/Pichia ohmeri）
Candida duobushaemulonii[B]	似平滑念珠菌[B]（Candida metapsilosis）	格特隐球菌[B]（Cryptococcus gattii）	糠秕马拉色菌（Malassezia furfur）
无名念珠菌（Candida famata）	挪威白念珠菌（Candida norvegensis）	新型隐球菌[V]（Cryptococcus neoformans）	厚皮马拉色菌（Malassezia pachydermatis）
光滑念珠菌（Candida glabrata）	拟平滑念珠菌[B]（Candida orthopsilosis）	新型隐球菌格鲁比变种[B]（Cryptococcus neoformans var. grubii）	胶红酵母（Rhodotorula mucilaginosa）
季也蒙念珠菌（Candida guilliermondii）	近平滑念珠菌（Candida parapsilosis）	新型隐球菌新型变种[B]（Cryptococcus neoformans var. neoformans）	酿酒酵母（Saccharomyces cerevisiae）
希木龙念珠菌（Candida haemulonii）	近皱褶念珠菌念珠菌[B]（Candida pararugosa）	念珠状地丝菌[B]（Geotrichum candidum）	阿萨西毛孢子菌（Trichosporon asahii）
平常念珠菌（Candida inconspicua）	pelliculosa 念珠菌（Candida pelliculosa）		皮瘤毛孢子（Trichosporon inkin）
中间念珠菌（Candida intermedia）	皱褶念珠菌[V]（Candida rugosa）		黏液毛孢子菌[V]（Trichosporon mucoides）
乳酒念珠菌（Candida kefyr）	热带念珠菌（Candida tropicalis）		黏液毛孢子菌群[B]（Trichosporon mucoides group）
克柔念珠菌（Candida krusei）			
丝状真菌			
产菌核枝顶孢[V]（Acremonium sclerotigenum）	皮炎芽生菌[V]（Blastomyces dermatitidis）	荚膜组织胞浆菌[V]（Histoplasma capsulatum）	少根根霉复合群[V]（Rhizopus arrhizus complex）
互格交链链格孢[V]（Alternaria alternata）	斑替枝孢瓶霉[V]（Cladophialophora bantiana）	霍夫曼油瓶霉[V]（Lecythophora hoffmannii）	小孢根霉复合群[V]（Rhizopus microsporus complex）
巴西曲霉[V]（Aspergillus brasiliensis）	粗/波萨达斯球孢子菌[V]（Coccidioides immitis/posadasii）	伞状横梗霉[V]（Lichtheimia corymbifera）	基利帚枝霉[V]（Sarocladium kiliense）
Aspergillus calidoustus[V]	夏威夷弯孢霉[V]（Curvularia hawaiiensis）	奥杜盎小孢子菌[V]（Microsporum audouinii）	尖端赛多孢霉[V]（Scedosporium apiospermum）
黄/米曲霉[V]（Aspergillus flavus/oryzae）	长穗弯孢霉[V]（Curvularia spicifera）	犬小孢子菌[V]（Microsporum canis）	多育赛多孢霉[V]（Scedosporium prolificans）
烟曲霉[V]（Aspergillus fumigatus）	絮状表皮癣菌[V]（Epidermophyton floccosum）	石膏样小孢子菌[V]（Microsporum gypseum）	申克孢子丝菌复合群[V]（Sporothrix schenckii complex）
缓慢曲霉[V]（Aspergillus lentulus）	皮炎外瓶霉[V]（Exophiala dermatitidis）	racemosus 毛霉复合群[V]（Mucor racemosus complex）	趾间毛癣菌[V]（Trichophyton interdigitale）
构巢曲霉[V]（Aspergillus nidulans）	毒物外瓶霉[V]（Exophiala xenobiotica）	多变拟青霉复合群[V]（Paecilomyces variotii complex）	红色毛癣菌[V]（Trichophyton rubrum）
黑曲霉复合群[V]（Aspergillus niger complex）	喙状明脐菌[V]（Exserohilum rostratum）	产黄青霉[V]（Penicillium chrysogenum）	发癣毛孢子菌[V]（Trichophyton tonsurans）
聚多曲霉菌[V]（Aspergillus sydowii）	尖孢镰刀菌复合群[V]（Fusarium oxysporum complex）	波氏假阿利什霉[V]（Pseudallescheria boydii）	疣状毛癣菌[V]（Trichophyton verrucosum）

（续 表）

丝状真菌			
土曲霉复合群[V]（Aspergillus terreus complex）	层生镰刀菌[V]（Fusarium proliferatum）	淡紫紫孢霉[V]（Purpureocillium lilacinum）	紫色毛癣菌[V]（Trichophyton violaceum）
花斑曲霉[V]（Aspergillus versicolor）	茄病镰刀菌复合群[V]（Fusarium solani complex）	赭褐罗萨姆森菌复合群[V]（Rasamsonia argillacea complex）	

注：[a] Cyberlindnera jadinii 已获得 FDA 许可，用于 MALDI Biotyper CA 系统；而 Candida utilis 已获得 FDA 许可用于 Vitek MS 系统；前者是后者的（型）变种；[B] 仅 MALDI Biotyper CA 系统获得 FDA 许可；[V] 仅 Vitek MS 系统获得 FDA 许可

项研究显示 MALDI-TOF MS 的应用可以更早地优化指导临床抗菌治疗[49-50]，还可省去对一些冷僻细菌的 DNA 测序费用、减少废物的处理，避免某些肠道病原菌的筛选试验（如沙门菌属的三糖铁琼脂试验）和质量控制，也减少了实验室技术人员技能培训与消除实验方法更迭的劳动[51]。

（一）需氧细菌鉴定

Wang 等评估了 Vitek MS IVD 数据库 v2.0 系统对源自临床样本的 1061 种细菌和 120 种酵母菌临床鉴定能力，99.5％的菌株被正确鉴定，其中 96％鉴定到种水平，4％鉴定属水平，只有 0.1％的菌株鉴定错误[52]。Richter 等进行的一项多中心研究比较了 Vitek MS v2.0 和 16S rRNA 基因测序（根据需要进行补充表型测试）在鉴定 965 种肠杆科细菌方面的能力，这些菌株包括了 17 个属和 40 个种[53]。MALDI-TOF MS 结果同参考方法检测结果相符率达 97％，其中 84％正确鉴定至种水平，13％正确鉴定至属水平，2％未能鉴定；7 株的属鉴定不正确，8 株在种水平被误判。Branda 等对 Vitek MS v2.0 系统进行了多中心评估，用于鉴定苛养革兰阴性菌（包括嗜血杆菌、弯曲杆菌、奈瑟菌、嗜肺军团菌和 HACEK 簇群）。其结果显示了准确的种水平鉴定能力，在 226 份菌株中，其正确鉴定到种水平的达 96％，1％鉴定到属水平[54]。

美国 FDA 510(k) 提交的一份多中心试验评估了关于 MALDI Biotyper CA 系统对 4399 株微生物的鉴定能力，其中包括 2262 株革兰阳性需氧菌、792 株革兰阴性需氧菌、530 株厌氧菌和 815 株酵母菌[55]，总体而言，在种和属水平上分别正确鉴定出了 96％和 98％的分离株。Faron 等对 Bruker MALDI Biotyper CA 系统进行了一项作为 FDA 临床试验部分的多中心评估研究，用以鉴定革兰阴性需氧菌[56]。该研究中的 2263 株革兰阴性需氧菌包括了 23 个属和 61 个种；将其结果与 DNA 测序和（或）Vitek 2 进行比较发现，总体上 Biotyper CA System 在属水平和种水平的正确鉴定率分别为 99.8％和 98％[56]。Schulthess 等评估了 Bruker 系统对苛养革兰阴性菌的鉴定能力，并用 3 种不同的样品制备方法处理 151 株临床分离株后进行了比较[57]，按照制造商解释标准进行的直接菌落测试法获得的鉴定结果显示，种和属水平的正确鉴定率均较低，分别为 43％和 33％，23％的分离株未被鉴定出，并出现 2 个错误鉴定（1％）。靶标板上甲酸制备法和乙醇-甲酸提取制备法的种水平正确鉴定率分别提高到了 46％和 54％。将种水平截断值（Cutoff 值）降低到 1.8，可将鉴定率提高至 66％，而不会增加错误鉴定率[57]。Magnette 等的结果表明，Bruker 系统仅能正确鉴定出 94 株狗咬二氧化碳噬纤维菌（*Capnocytophaga canimorsus*）中的 16 株（占 17％），却能正确鉴定出所有 10 株犬咬二氧化碳噬纤维菌（*Capnocytophaga cynodegmi*）[58]。然而，在用户开发的数据库中添加 51 株狗咬二氧化碳噬纤维菌和 8 株犬咬二氧化碳噬纤维菌质谱信息后，即能鉴定出这 2 个种的所有分离株。

Porte 等比较了 Bruker 和 Vitek MS 平台，用以鉴定 804 株细菌，其中包括 252 株肠杆菌科、126 株非发酵菌、36 株其他革兰阴性杆菌、279 株革兰阳性球菌、32 株革兰阳性杆菌、32 株厌氧菌和 47 株酵母菌[59]。尽管 Vitek MS 的种水平鉴定率要高于 Bruker 系统（主要表现在凝固酶阴性葡萄球菌和念珠菌方面），但两个系统在属水平均能正确地鉴定出 98％的分离株。Zangenah 等比较了 Vitek MS 和 Bruker 系统，用以鉴定 66 株巴斯德菌；2 个系统均能鉴定出 89％的分离株（其未能鉴定的菌株部分与数据库缺陷有关）[60]。

Pailhoriès 等丰富了 Vitek MS 系统的 SARAMIS 数据库，以改善醋酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合群的种水平鉴定能力，并用 100 株菌株验证了参考质谱和 SuperSpectra 的鉴定性能；结果表明所有分离株均能通过其用户开发的数据库正确鉴定出来[61]。Jeong 等的结果表明，Bruker 系统与用户开发的数据库相结合可以可靠地鉴定不动杆菌属，而默认的 Bruker 数据库难以做到[62]。McAuliffe 等的结果显示，虽然 Vitek MS 平台将鲍曼不动杆菌准确地鉴定到种水平，但其亦能在种水平错误地鉴定成医院不动杆菌（*A. nosocomialis*）和皮氏不动杆菌（*A. pittii*）[63]。

早期研究中，Lambiase 等的结果显示，通过 Bruker 系统可以鉴定洋葱伯克霍尔德菌复合群（*Burkholderia cepacia* complex）成员，包括新洋葱伯克霍尔德菌（*B. cenocepacia*）、洋葱伯克霍尔伯菌（*B. cepacia*）、稳定伯克霍尔德菌（*B. stabilis*）和越南伯克霍尔德菌（*B. vietnamiensis*）[64]。但在另一项早期研究中，Fehlberg 等的结果表明，Bruker 系统 23%的洋葱伯克霍尔德菌复合群在种水平鉴定错误，最常发生于污染伯克霍尔德菌（*B. contaminans*）和洋葱伯克霍尔德菌间[65]。Plongla 等利用 Vitek MS（SARAMIS RUO v4.12 数据库、具有 v2.0 和 v3.0 数据库的 IVD 系统，以及初始版 v3.1 Knowledge Base 数据库）评估了 195 份保存的非发酵革兰阴性杆菌的鉴定能力。这些细菌来自囊性纤维化呼吸道标本，并在胰蛋白酶大豆琼脂（含 5%羊血、MacConkey 琼脂或 B. cepacia 选择性琼脂）中孵育生长 24 h、48 h 和 72 h[66]。统计学分析结果认为与伯克霍尔德菌属的种水平和其他非发酵菌的属水平相匹配的鉴定是令人满意的。总体而言，对于在含有 5%羊血胰大豆胨琼脂上孵育生长 24 h 的分离株，使用SARAMIS RUO 数据库、v2.0、v3.0 和 v3.1 Knowledge Base 数据库分析后，分别获得了 59%、46%、84%和 89%的满意结果。B. cepacia 选择性琼脂和 MacConkey 琼脂也表现出相似的趋势，但两者的满意结果低于羊血琼脂。使用 RUO 数据库鉴定较陈旧的菌株观察到令人满意的结果显著下降。较新的数据库改进了对新洋葱伯克霍尔德菌、污染伯克霍尔德菌、潘多拉菌种和黏泥异地菌种的鉴定能力。使用 v3.1 数据库可分别鉴定出 64%洋葱伯克霍尔德菌、86%罗尔斯顿菌属、67%贪铜菌属和 67%草螺菌属。所有支气管败血鲍特菌（*Bordetella bronchiseptica*）能被正确鉴定出来，却不能鉴定其他鲍特菌。所有多食伯克霍尔德菌（*B. multivorans*）、越南伯克霍尔德菌（*B. vietnamiensis*）、唐菖蒲伯克霍尔德菌（*Burkholderia gladioli*）、无色杆菌属（*Achromobacter* species）、苍白杆菌属、鞘氨醇杆菌属（*Sphingobacterium* species）和伊丽莎白女王菌属（*Elizabethkingia* species）可被正确鉴定。但对于新数据库鉴定金黄杆菌属而言，令人满意的结果所占百分比有所下降，并且在鉴定洋葱伯克霍尔德菌（*B. cepacia*）能力方面，v3.0 或 v3.1 数据库与 v2.0 数据库相当。

MALDI-TOF MS 对于葡萄球菌[67-68]、β-溶血性链球菌[69]、气球菌[70]和肠球菌的整体鉴定性能都非常出色。Moon 等评估了 Vitek MS 鉴定 424 革兰阳性球菌的能力；它能正确鉴定其中 98%的分离株，包括 92%的葡萄球菌，98%的链球菌和 100%的肠球菌[71]。Rychert 等做了一项评估 Vitek MS v2.0 系统以鉴定 1146 株革兰阳性需氧菌的多中心研究[72]，结果显示可对 93%的菌株提供单个准确的种水平鉴定报告。

该技术的早期版本（尤其是 Bruker 系统）在区分肺炎链球菌和缓症/口腔链球菌方面存在不足[73-74]，但随着数据库的更新改进，这一缺憾得以弥补[75-76]。尽管 MALDI-TOF MS 能够可靠地在种水平鉴定出草绿色链球菌，但它可能无法区分某些密切相关的种群。Bruker 3.0 数据库可以可靠地鉴定出咽峡炎链球菌（*Streptococcus anginosus*）和星座链球菌（*Streptococcus constellatus*），但难以可靠地鉴定中间型链球菌（*Streptococcus intermedius*）[77]。Isaksson 等比较了 Bruker 和 Vitek MS 系统在鉴定从 63 例心内膜炎患者分离出的草绿色链球菌方面的能力[78]。结果显示，正确鉴定出嵴链球菌（*Streptococcus cristatus*）、戈登链球菌（*Streptococcus gordonii*）和血链球菌（*Streptococcus sanguinis*），却没能正确鉴定出米氏链球菌（*S. mitis*）、口腔链球菌（*S. oralis*）和提谷那链球菌（*Streptococcus tigurinus*）[78]。Zhou 等的结果表明，Bruker 和 Vitek MS 系统在鉴定 181 份草绿色链球菌分离株方面的正确率分别为 88%和 99%[73]。MALDI-TOF MS 可以鉴定毗邻颗粒链菌（*Granulicatella adiacens*）、缺陷乏养菌（*Abiotrophia defectiva*）[79]、马链球菌（*Strepto-*

coccus equi）[80]和猪链球菌（*Streptococcus suis*）[81]，其中只有前2种菌信息收录于以上2个系统平台的FDA许可数据库中。

除密切相关的棒杆菌属和棒状细菌外，其他所有菌种都可以被可靠地鉴定出来，如溶血隐秘杆菌（*Arcanobacterium haemolyticum*）和马红球菌（*Rhodococcus equi*）[82-85]。Schulthess等利用Bruker系统评估了3种不同MALDI-TOF MS样本准备方法对190株特征明确的革兰阳性杆菌分离株鉴定的影响[86]。采用制造商推荐的解释标准判断结果显示，靶标板甲酸制备和乙醇-甲酸提取法的鉴定率要高于直接菌落克隆检测鉴定率[86]。将种水平截断值（Cutoff）从2降至1.7，可提高种水平鉴定率[86]。随后一项前瞻性研究通过Bruker系统分析了215株临床革兰阳性菌株，通过靶标板甲酸制备处理和种水平截断值（Cutoff）设置为1.7后，在属和种水平上的鉴定一致性分别达到87%和79%。此外，通过用户开发的数据库，未鉴定分离株比例从12%下降至6%[86]。尽管MALDI-TOF MS数据库还不完整，但它可用于鉴定放线菌科，包括放线菌属、放线棒菌属、隐秘杆菌属、动弯杆菌属、储珀菌属和小弯菌属[87]。通过增加提取操作步骤并不能提高Vitek MS IVD系统对放线菌科的鉴定率，但在运用Bruker系统进行分析之前，靶标板甲酸提取处理确实能提高鉴定率[87]。De Alegria Puig等比较了Vitek MS和Bruker系统对马红球菌、海洋迪茨菌、*Dietzia natronolimnaea*和*Dietzia cinnamea*的鉴定能力[88]。Bruker系统在种水平上对154株鉴定正确率达85%，如果将种截断值降低至（或大于）1.75，该比例将升至99%；提取处理后，Vitek MS可在种水平正确鉴定出84%的分离株[88]。

MALDI-TOF MS也可准确鉴定出对实验室人员有危害性的弗朗西斯菌、布鲁菌种及其他管制危险微生物；但无论是FDA许可的Bruker还是bioMérieux系统数据库，均未包含这些微生物[89-90]，而使用Bruker的“安保相关”数据库可以对其进行鉴定[91]。由于其他数据库无法将这些危险微生物与其密切相关微生物区分开来[例如，类鼻疽伯克霍尔德菌（*B. pseudomallei*）会被鉴定为泰国伯克霍尔德菌（*B. thailandensis*），尽管鉴定分数较低]，因此，如果不使用上述特定“安保相关”数据库鉴定，将可能导致实验室处于潜在危险病原体的暴露风险之中[90]。Vitek MS IVD数据库包含有炭疽芽胞杆菌和鼠疫耶尔森菌的质谱信息，Vitek MS RUO数据库v4.12包含许多特定管制病原菌质谱信息（包括类鼻疽伯克霍尔德菌），但这些均未获得FDA许可[90]。处理潜在危险微生物时，实验室必须采取安全的操作规范。有研究表明，如果MALDI-TOF MS检测靶标板全程在生物安全柜中进行操作、且所检菌都经70%甲酸和（或）基质“处理”，则可通过直接菌落检测或靶标板甲酸制备方法安全地鉴定有害的无芽胞菌[92]。如果无法用70%甲酸和（或）基质完全覆盖细菌沉积物，则可能无法杀灭所有细菌[93]。其中，基于溶剂灭活的操作方案也有所报道[93]。对于产生芽胞的有害细菌，建议使用基于试管操作的提取物和增加提取后过滤步骤[94]。霍乱弧菌可以通过MALDI-TOF MS进行鉴定[95]，但仅有Vitek MS系统通过了该菌的FDA鉴定许可。

（二）厌氧细菌鉴定

MALDI-TOF MS可用于鉴定许多临床相关的厌氧菌[96-97]。Hsu和Burnham评估了带有Biotyper 3.0软件系统的Bruker Microflex鉴定厌氧菌的性能，同时检验了靶标板甲酸制备和其他分析前因素对其鉴定过程的影响。该研究收集了101份厌氧菌株，结果表明，靶标板甲酸制备可提高准确鉴定的速度，且不会导致错误鉴定[98]。他们同时发现≥1.7的鉴定分数（Score）设置可以最大程度提高鉴定率；MALDI-TOF MS还可以正确鉴定在次优条件下生长的厌氧菌，例如在选择性培养基上和暴露于氧气后。Veloo等使用Bruker系统研究了孵育时间（24～96 h）和暴露于氧气对其鉴定的影响[37]。革兰阴性厌氧菌培养48 h和革兰阳性厌氧菌培养72 h后，可获得可靠的种水平鉴定。暴露于氧气不会影响革兰阳性菌的鉴定结果，但坏死梭杆菌（*Fusobacterium necrophorum*）和中间普雷沃菌（*Prevotella intermedia*）在暴露于氧气24 h和48 h后则无法被鉴定出，而受试的其他革兰阴性菌在暴露于氧气48 h之后依然可以被鉴定出[37]。在早期研究中，Schmitt等使用Bruker系统、用户开发的数据库和靶标板甲酸制备法，评估了253种临床来源多

样的厌氧菌鉴定情况。结果显示，在属和种水平分别正确鉴定出92%和71%分离株[99]。Veloo等[100]通过创建用户开发数据库，进一步优化了Bruker系统，用以鉴定革兰阳性厌氧球菌，包括各种消化链球菌属、厌氧球菌属和嗜胨菌属，以及黑色消化球菌、大芬戈尔德菌、微小微单胞菌和不解糖默多克菌。优化后的数据库接受了140份临床分离株的验证，结果表明它在种水平鉴定革兰阳性厌氧球菌的正确率从54%升至82%。Chean等使用Bruker和Vitek MS系统比较了52份梭菌属菌株的鉴定情况。Vitek MS可以正确鉴定出90%的分离株，并且不受样品制备的影响，而Bruker系统则依赖于样品制备，其中69%的分离株使用靶标板甲酸制备标本可获得在种水平的正确鉴定结果[101]。Handal等[102]研究了从血液培养物获得的197份厌氧菌，包括拟杆菌、梭状芽胞杆菌、普氏杆菌、梭菌属细菌和革兰阳性厌氧球菌。结果发现，其中95%被鉴定至属水平，87%被鉴定至种水平；但粪类拟杆菌被错误鉴定为多形拟杆菌，溶木聚糖拟杆菌被错误鉴定为卵形拟杆菌(*Bacteroides ovatus*)，而多尔拟杆菌(*Bacteroides dorei*)则被错误鉴定为普通拟杆菌(*Bacteroides vulgatus*)[2]。Lee等评估了Vitek MS IVD v1.1数据库在鉴定274株厌氧菌方面的性能，Vitek MS能够将84%的分离株正确地鉴定至种水平，7%的分离株鉴定至属水平，9%未被鉴定或被错误鉴定[103]。Yunoki等使用Bruker系统鉴定了170株临床分离的厌氧菌，包括14个属的21种革兰阳性菌和11个属的29种革兰阴性菌[104]。结果显示，MALDI-TOF MS分别在种和属水平上正确鉴定出80%和85%的分离株[104]。有报道称，用户添加了Bruker Reference Library 3.2.1.0后，在83%的病例中成功鉴定出了更多的罕见厌氧菌，包括普雷沃菌属(*Prevotella*)[105]。Gürsoy等运用Bruker系统测试了123份口腔普雷沃菌分离株。结果显示，其在属水平的鉴定率达100%，其中在种水平的鉴定率达到89%(设置鉴定分数≥2.0)；对数据库中缺少的橘红色假单胞菌(*Pseudomonas aurantiaca*)和空肠普雷沃菌(*Prevotella jejuni*)，其也能正确鉴定到属水平[106]。Barreau等运用Bruker系统对1325份厌氧菌进行了测试，结果在种水平的正确鉴定率达93%(所使用的标准截断值/Cutoff比制造商建议的更低)[96]。Garner等用Vitek MS v2.0系统评估了651份厌氧菌分离株，结果在种水平的正确鉴定率达91%[107]。

(三)分枝杆菌和诺卡菌属鉴定

已有多项研究报道了通过MALDI-TOF MS进行分枝杆菌的鉴定工作。出于安全性考虑，该项工作需要通过特殊处理过程，以杀灭危险的受检细菌；同时，需要破坏结块聚集的细胞团及通过多种处理策略破坏细胞被膜[108-109]。也有文献报道可以通过菌落直接进行MALDI-TOF MS检测[110]。MALDI-TOF MS可以鉴定大多数临床相关分枝杆菌种属(附警告说明)。结核分枝杆菌复合群成员可能仅在复合群水平鉴定，且某些种可能无法很好地彼此区分。尽管区分脓肿分枝杆菌亚种一直具有挑战性(包括脓肿分枝杆菌脓肿亚种、马赛亚种和博氏亚种)，但仍有几位研究者报道了其特定的鉴别峰[111-116]。至今，MALDI-TOF MS仍无法区分奇美拉分枝杆菌(*Mycobacterium chimaera*)和胞内分枝杆菌(*Mycobacterium intracellulare*)。但Pranada等最近报道了种特异性谱峰，可用于区分这2个种菌株[117]。FDA许可的Vitek MS版本包括了17种分枝杆菌、结核分枝杆菌复合群和偶发分枝杆菌群(表5-5)。Bruker拥有一款分枝杆菌文库，但未经FDA批准。

Girard等使用Vitek MS建立了一款用户开发数据库，用以鉴定分枝杆菌和诺卡菌[118]。对于分枝杆菌属种的总体鉴定性能为90%，对于诺卡菌属种为88%。但对于许多分枝杆菌属种的分离株，还无法实现鉴定，这在大多数情况下可能归因于所产生的聚合物掩盖了种特异性蛋白质的模式谱峰。Leyer等通过两版数据库SARAMIS v4.12 RUO和IVD v3.0[119]对Vitek MS进行了评估；他们将111株分枝杆菌分离株蛋白质经提取检测后所获得的相同谱峰与两款数据库进行匹配比较。结果表明，IVD v3.0数据库优于SARAMIS v4.12，且在7H10固体培养基上生长的菌株鉴定率从67%提高到94%，在MGIT仪器(Becton Dickinson)上液体培养基中生长的菌株鉴定率从62%提高到91%。

Buckwalter等报道指出，使用Bruker系统和用户开发数据库的MALDI-TOF MS技术可以鉴

定88%的分枝杆菌种、90%的诺卡菌种和51%的其他需氧放线菌[120]。Rodriguez-Temporal等使用分枝杆菌文库v3.0在Bruker系统中对240份临床分离株(包含了41个种的非结核分枝杆菌)的鉴定进行了评估;结果显示其正确鉴定率达80%[设置鉴定分数(Score)≥1.7][121]。Kodana等使用Bruker系统(MALDI Biotyper 3.1软件和MALDI Biotyper Reference Library 4.0.0.1版和分枝杆菌库1.0版)研究了75种临床非结核分枝杆菌菌株[122]。结果表明,其对鸟分枝杆菌(Mycobacterium avium)的鉴定率达96%、对胞内分枝杆菌(M. intracellulare)的鉴定率达100%;堪萨斯分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、偶发分枝杆菌(M. fortuitum)、戈登分枝杆菌(Mycobacterium gordonae)、龟分枝杆菌(Mycobacterium chelonae)和产黏液分枝杆菌(Mycobacterium mucogenicum)也均能被鉴定;然而,2份麻风杆菌分离株未能被鉴定出。Mediavilla-Gradolph等使用Bruker系统对临床样本分离出的66份非结核分枝杆菌的鉴定性能进行了评估,结果显示MALDI-TOF MS为98%的分离株提供了正确的鉴定报告[123]。Rodriguez-Sanchez等收集了109份非结核分枝杆菌分离株,用以评估Bruker分枝杆菌库v3.0,结果表明其在鉴定分数(Score)设置为≥1.8时的正确鉴定率达92%[124]。Ceyssens等收集了72份临床结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌,用于评估Bruker分枝杆菌文库v4.0,结果显示,在种水平的鉴定率达90%,当鉴定分数(Score)阈值设置降低至1.65时,鉴定水平可提至99%[125]。Quinlan等收集了65份非结核分枝杆菌和86份结核分枝杆菌复合群,用于评估Bruker系统v3.1。结果显示,MALDI-TOF MS技术的正确鉴定率达83%;对于结核分枝杆菌复合群分离株而言,从固相和液体培养而来的菌株其正确鉴定率分别达97%和96%;而对于非结核分枝杆菌分离株,相应来源菌株的正确鉴定率达76%和52%[126]。

Mather等比较测试了2种简化的蛋白质提取方案,这些方案分别由华盛顿大学和bioMérieux开发,并可与Bruker和bioMérieux系统配套使用[127]。2种方案均包括在乙醇环境下使用二氧化硅颗粒珠进行涡旋搅拌的操作。Bruker商品化数据库也整合了由用户开发而来的包含123种临床分枝杆菌菌株的数据库。当采用华盛顿大学方案以及整合数据库分析时,代表了18种分枝杆菌属的198份临床菌株的95%可被正确鉴定到种的水平;bioMérieux方案和Vitek MS系统对94%的菌株可做到种的水平鉴定。相比之下,未整合前的Bruker数据库种水平鉴定率仅能达79%,尽管使用较低鉴定分数(Score)阈值≥1.7,可将鉴定率提高到94%,但依然存在2份错误鉴定结果(该错误原因与临床相关性不大)[127]。Park等利用Bruker和Vitek MS系统比较了MALDI-TOF MS技术鉴定加热和非加热液体培养基中生长培养的分枝杆菌临床分离株的性能[128]。加热方法制备的206份临床样本在Bruker和Vitek MS系统中的鉴定率分别为90%和61%;Bruker和Vitek MS系统鉴定结核分枝杆菌复合群、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、脓肿分枝杆菌和偶发分枝杆菌等的准确性达100%,非加热方法制备的121个临床样本在Bruker和Vitek MS系统中的鉴定率分别为61%和69%[128]。

FDA许可的Vitek MS系统包含有12种诺卡菌(表5-5)。Girard等利用Vitek MS系统对164份诺卡菌进行鉴定,结果显示其种水平正确鉴定率可达94%[129]。Khot等采用带有用户补充数据库的Bruker系统鉴定诺卡菌,结果显示其能在种和复合群水平上的正确鉴定率分别为83%和80%,属水平上的正确鉴定率达94%[130]。Blosser等的一项多中心研究利用Bruker系统及3款诺卡菌库(分别出自Bruker、美国国立卫生研究院和俄亥俄州立大学)对诺卡菌种进行了分析,皆证明了利用MALDI-TOF MS技术可快速鉴定诺卡菌种,并反映了跨机构的由单个实验室开发的MALDI-TOF MS数据库应用能力[131]。

(四)酵母菌鉴定

MALDI-TOFMS可以鉴定酵母菌,且性能优于一些传统的表型鉴定系统[132]。它可以鉴别都柏林念珠菌(*C. dubliniensis*)和白念珠菌(*C. albicans*),皱褶念珠菌(*C. rugosa*)和近皱褶念珠菌(*C. pararugosa*),挪威白念珠菌(*C. norvegensis*)、克柔念珠菌(*C. krusei*)和平常念珠菌(*C. inconspicua*),近平滑念珠菌(*C. parapsilosis*)、拟平滑念珠菌(*C. orthopsilosis*)和似平滑念珠菌(*C. metapsilosis*)[14],新型隐球菌(*C. neoformans*)和

格特隐球菌(*C. gattii*)[133,134]。对于鉴定冷僻菌种如无名念珠菌(*C. famata*)等,MALDI-TOF MS 可能优于目前其他系统[69]。Fatania 等对 Bruker 系统进行了评估,收集并鉴定了 200 株临床上重要的酵母菌株,包括 19 个种和 5 个属。结果显示,MALDI-TOF MS 技术和常规鉴定方法对 182 种分离株在种水平的鉴定结果一致(占 91%)[135]。Dhiman 等评估了 Bruker 系统对 138 株常见和 103 株不常见酵母菌株的鉴定情况,该系统种水平的鉴定准确率分别可达 96% 和 85%[136]。虽然既往的研究对酵母进行预提取处理,但作者和其他研究组应用了甲酸覆盖后直接检测菌落的策略(图 5-1)[137-138]。Westblade 等进行了一项多中心研究,评估了 VitekMS 系统 v2.0 对 852 株酵母菌的鉴定效果,包括假丝酵母菌属、新生隐球菌和其他临床相关的酵母菌。直接使用靶板后用甲酸覆盖进行检测,鉴定到属水平的正确率为 97%,种水平正确率为 96%[137]。Jamal 等评估了 Bruker 和 Vitek MS 系统鉴定 188 份临床重要酵母菌的性能[139]。2 种系统对 93%的病例菌株均能准确鉴定。Vitek MS 有 3 株分离株未能鉴定出,且有 9 株拟平滑念珠菌(*C. orthopsilosis*)被错误鉴定为近平滑念珠菌(*C. parapsilosis*)(数据库未包含拟平滑假丝酵母信息);Bruker 系统有 11 份分离株未能鉴定或错误鉴定,尽管其他 14 份菌株被正确地鉴定出,但因其鉴定分数(Score)为<1.7[139],所以结果并不可靠。Lee 等亦比较了 Bruker 和 Vitek MS 系统,鉴定了包含 42 个种的酵母菌的 309 份临床分离株(4 种常见假丝酵母菌、新生隐球菌和 37 种罕见酵母菌)[140]。所有的分离株皆进行靶标板甲酸制备处理,如果鉴定结果显示为"无鉴定结果",则采用靶标板甲酸制备或仅针对 Bruker 系统的基于试管提取法处理后,对分离株进行重新测试。初步分析后,两款系统均能正确鉴定所有 158 份分离株(其中包括 4 种常见酵母菌种)。就初次靶标板甲酸制备、再次靶标板甲酸制备和基于试管提取制备处理的比较而言,Bruker 系统对 23 份新生隐球菌分离株的正确鉴定率分别为 9%、30% 和 100%,而 Vitek MS 在对接受初次靶标板甲酸制备的所有新生隐球菌均能鉴别。两款系统在鉴定 37 份罕见酵母菌种方面表现相当;这些菌株均经历初次靶标板甲酸制备处理(Bruker,74%;Vitek MS,73%),或再次靶标板甲酸制备处理(Bruker,82%;Vitek MS,73%)。Won 等通过 Vitek MS 系统评估了酵母菌血流分离株的鉴定准确性,结果显示其正确鉴定达 96%、错误鉴定为 1%及 3%未能鉴定[141]。Mancini 等比较了 Bruker 和 Vitek MS 系统鉴定酵母菌的性能。结果表明,在种一级的正确鉴定率与商品化数据库相当(分别为 90% 和 84%),但是采用 Bruker 系统和用户开发数据库则可获得 100%鉴定率。Vitek MS 系统的错误鉴定率高于 Bruker 系统[142]。Wang 等评估了中国全国医院侵入性真菌监测网计划(2012—2013 年)收集的包含 41 个种的 2683 份酵母菌株。与 Vitek MS 系统相比,Bruker Biotyper MS 系统在鉴定所有酵母菌分离株(99% *vs.* 95%)及假丝酵母菌和假丝酵母菌相关菌种(99% *vs.* 96%)方面显现出更高的准确率[143]。Fraser 等评估了 Bruker 系统分析鉴定临床酵母分离株的能力[144]。他们研发了一种简化的快速提取方法,将其用于包含了 71 个种的 6343 份酵母菌分离株中,然后进行 MALDI-TOF MS 分析。其简化的提取方案可以正确鉴定 94%的分离株,经完全提取处理后又再鉴定出剩余 6%的分离株。

Denis 等使用 Bruker 系统开发并评估了一款 MALDI-TOF MS 数据库,用来鉴定马拉色菌属(*Malassezia* species)[145]。使用包含了 6 个种的 45 份菌株来建立数据库,其中的 6 个种包括糠秕马拉色菌(*Malassezia furfur*)、合轴马拉色菌(*Malassezia sympodialis*)、斯洛菲马拉色菌(*Malassezia slooffiae*)、球形马拉色菌(*Malassezia globosa*)、限制性马拉色菌(*Malassezia restricta*)和厚皮马拉色菌(*Masasseia pachydermatis*),并利用额外的 40 份菌株测试了该数据库。所有分离株的鉴定分数均设为$_{T}$2。FDA 许可的数据库中均包含了厚皮马拉色菌和糠秕马拉色菌(表 5-5)。

皮瘤毛孢子(*Trichosporon inkin*)和阿萨西毛孢子菌(*Trichosporon asahii*)也均包含在 FDA 许可的数据库中,同时黏液毛孢子菌(*Trichosporon mucoides*)包含在 Vitek MS 数据库中,以及黏液毛孢子菌群(*Trichosporon mucoides* group)包含在 MALDI Biotyper CA 系统中(表 5-5)。de Almeida 等使用 Bruker 系统对 16 份毛孢菌种(*Trichosporon* species)进行了 MALDI-TOF

MS分离鉴定[146]，几种蛋白质提取的方法也进行了评估。结果显示，用70%甲酸孵育30 min所产生的谱图鉴定分数最高。在测试的6款数据库中，有一款由18份参考菌株和7份临床分离株组成的数据库，针对68份临床分离株的正确鉴定率达99%。

(五)丝状真菌鉴定

丝状真菌的表型易变，其蛋白质谱可随生长条件及分析菌丝区域的不同而变化，但或许可通过MALDI-TOF MS技术对其进行鉴定[147]。FDA许可的Vitek MS系统包括48种丝状真菌(种或复合群)条目，以及双相菌(dimorphic pathogens)和皮肤癣菌(dermatophytes)。Bruker拥有一款RUO丝状真菌数据库。待检样品的制备因研究而异，bioMérieux和Bruker提倡的用于霉菌样品的制备手段也在不断更新[147]。

Iriart等利用Vitek MS v1系统/v1.1数据库和直接上板测试操作，成功鉴定了44株曲霉菌中82%的菌株(包括数据库中存在的所有菌株)[148]。McMullen等利用Vitek MS开展了霉菌的鉴定研究，他们评估了包含43个属的319份霉菌分离株，结果显示67%的菌株可被Vitek MS Knowledge Base v3.0正确鉴定，当辅助结合了更新的SARAMIS数据库后，其正确鉴定率提至77%[149]。

De Carolis等使用Bruker Biotyper系统开发了曲霉菌(Aspergillus species)、镰刀菌(Fusarium species)和毛霉菌(Mucorales)的数据库，并用其鉴定了94份菌株，其种水平的正确率高达97%[150]。Gautier等使用内部开发的质谱库评估了Bruker平台的性能，并称可以提高其在种水平的鉴定准确性[151]。MALDI-TOF MS技术的应用在种水平上显著提高了霉菌鉴定的能力(达98%)。Lau等使用一种特殊的真菌提取流程和他们自己的质谱数据库(包括294份菌株，代表76个属和152个种)检测了421份霉菌，其种水平与属水平的鉴定准确率分别是88.9%和4.3%[152]。Lau等评估了Bruker系统通过直接转移方法鉴定霉菌和酵母培养物的性能，收集了59份临床菌株和马尔尼菲篮状菌(Talaromyces marneffei)模式菌株，结果显示，即使将原始数据库与Bruker v4.0.0.1和Filamentous Fungi Library 1.0结合使用，MALDI-TOF MS也无法鉴定以上菌株；但将该合并的数据库加入包含21株处于霉菌和(或)酵母生长期的马尔尼菲篮状菌的质谱信息后，所有处于霉菌或酵母生长期的菌株都可以正确鉴定到种水平[153]。De Almeida等使用他们自己的数据库，通过Bruker系统正确鉴定了巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)和*Paracoccidioides lutzii*[154]。Normand等最近报道使用Bruker系统对霉菌和皮肤癣菌进行了MALDI-TOF MS鉴定的决策标准，他们采用了自己的数据库和Bruker数据库，以及一组包含126个种的422份分离菌株，以测试其各种阈值和1～4个点(Spot)的鉴定结果。他们使用决策算法找到了最佳结果，该决策算法仅考虑4个点中最高的鉴定分数，鉴定分数阈值为1.7。通过对整块检测板进行测试后，可以鉴定出87%(用户开发的数据库)和35%(Bruker数据库)的分离株。将相同的规则应用于在数据库中至少存在3个亚种的菌株，可以鉴定出92%(用户开发的数据库)和47%(Bruker数据库)的菌株[155]。Huang等最近报道了他们使用Bruker系统测试374种临床丝状真菌分离株的经验，其在种和属水平的鉴定准确率分别为99%和100%[156]。Riat等使用MALDI-TOF MS与Bruker丝状真菌库1.0测试了48株霉菌，获得92%的鉴定准确率，鉴定分数为1.7[157]。Masih等使用Bruker系统和用户开发数据库可以鉴定95%的曲霉菌[158]。Park等评估了Bruker丝状真菌文库1.0用于鉴定345种临床曲霉分离株的能力[159]。与内部转录间隔区测序结果相比，在种复合群水平正确鉴定频率为95%和99%，截断值(Cutoff)分别为2.0和1.7；与β-微管蛋白基因测序结果相比，5个常见非模糊种的303份曲霉菌株在种水平的正确鉴定频率分别为96%(截断值2.0)和100%(截断值1.7)，但对6个不常见种的42份曲霉分离株则为5%(截断值1.7)和0%(截断值2.0)。Schulthess等评估了Bruker丝状真菌库1.0，他们首先研究了从临床来源的83份具有典型表型和分子特征的霉菌菌株(非皮肤癣菌和暗色真菌)，结果显示，根据制造商推荐的解释标准，属和种水平的鉴定率分别为78%和54%，降低种水平截断值至1.7，可以提高其种水平鉴定率至71%，而不会增加错误鉴定可能[160]。随后的前瞻性研究分析了200份连

续的临床霉菌分离株，当种水平截断值为 1.7 时，其属和种水平的鉴定准确率分别为 84%和 79%；17%分离株未能鉴定，并存在 4 个种水平的错误鉴定。Sleiman 等研发出一款用于鉴定曲霉菌、赛多孢霉属（*Scedosporium*）和镰刀菌（*Fusarium* species）数据库[161]，在针对 117 份分离株的鉴定过程中，相较于仅单独使用 Bruker 文库，将用户开发的数据库与 Bruker 丝状真菌库联合使用后种水平的鉴定得到明显改善（曲霉菌分别为 93%和 69%、镰刀菌分别为 84%和 42%、Scedosporium 分别为 94%和 18%）。Becker 等运用用户开发的数据库通过 Bruker 系统评估了 390 份临床分离株[162]，结果显示，MALDI-TOF MS 可在种水平上正确鉴定出 95%的分离株，而无须考虑鉴定分数值；当鉴定分数>1.7 时，其鉴定准确率为 86%。Singh 等研究了 19 家印度医疗中心患者的 72 份黑色素化真菌分离株，他们使用 Bruker 系统和用户开发的数据库分析后获得了 100%的鉴定率[163]。

Triest 等评估了 Bruker 系统和他们自己的数据库，对来自比利时微生物学/流行病学和流行病学菌种学联合会的 289 份 40 个种的镰刀菌菌株进行鉴定，没有发现任何种-复合群水平的错误鉴定，且获得了 83%的种水平鉴定准确率，若降低截断值，其鉴定准确率可提升至 91%[164]。

Dolatabadi 等利用带有用户开发数据库的 Bruker 系统鉴定了少根根霉（*Rhizopus arrhizus*）及其 *arrhizus* 和 *delemar* 2 个变种，以及小孢根霉（*Rhizopus microsporus*）[165]。Chen 等利用 Bruker 系统鉴定了 50 份临床霉菌分离株，包括马尔尼菲篮状菌（*T. marneffei*）、拟青霉（*Paecilomyces* species）、茄病镰刀菌（*Fusarium solani*）、根霉（*Rhizopus* species）和波氏假阿利什霉（*Pseudallescheria boydii*）[166]；根据其用户开发的数据库，*T. marneffei* 的鉴定准确率（鉴定分数≥2）为 86%；尽管 MALDI-TOF MS 技术和测序分析法对所有 7 株多变拟青霉（*Paecilomyces variotii*）、6 株茄病镰刀菌（*F. solani*）中的 4 株，4 株淡紫拟青霉（*Paecilomyces lilacinus*）中的 2 株，3 株根霉（*Rhizopus species*）中的 2 株，以及波氏假阿利什霉的鉴定结果一致，但其鉴定分数均为<1.7[167]。

使用适当的数据库，可以鉴定出皮肤癣菌[167-168]。FDA 许可的 Vitek MS 系统包括了表皮絮状菌、小孢子菌、犬小孢子菌、石膏小孢子菌、扁毛癣菌、疣状癣菌和紫毛癣菌。L'Ollivier 等回顾分析了 2008—2015 年间发表的 10 项研究后发现，基于 MALDI-TOF MS 的皮肤癣菌鉴定准确率介于 14%～100%，部分是由于处理过程不一致所致[169]。使用基于试管的提取步骤和结合了用户开发数据库的制造商数据库被认为对于准确的种水平鉴定至关重要。该技术不受其他常规临床实验室条件（例如，培养基类型、孵育时间和仪器）变化的影响。Packeu 等使用用户开发的数据库和 Bruker 系统对 176 份临床皮肤癣菌菌株进行了评估，孵育 3 天后，使用靶标板甲酸制备程序可正确鉴定 40%的菌株；增加孵育时间并使用提取制备程序后其鉴定准确率可达 100%[170]。Karabicak 等通过用户开发的数据库评估了 Bruker 系统的性能，用以鉴定 126 份皮肤癣菌（115 份临床分离株和 11 份参考菌株）；在属和种水平上，MALDI-TOF MS 通过使用用户补充的数据库可以正确鉴定 90%的菌株，而原始数据库为 52%；在低鉴定分数下其鉴定准确率可达 98%，而在推荐鉴定分数下则为 14%[171]。Calderaro 等还通过用户开发的数据库与 Bruker 系统评估了鉴定皮肤癣菌的能力，为验证所应用的数据库，64 份临床分离菌株接受了测试；使用用户开发的数据库正确鉴定了全部 64 份菌株（47 份的鉴定分数为>2.0，其余 17 份的鉴定分数为 1.7～2.0）[172]。

MALDI-TOF MS 用于霉菌鉴定的局限性仍然在于缺乏鉴定谱范围大而全的商品化数据库[147]。使用用户开发的数据库可获得基于 MALDI-TOF MS 的较高的鉴定率。希望随着时间的推移，商品化数据库将能涵盖更多的真菌菌株/种谱。

MALDI-TOF MS 技术亦存在一些局限性。有别于公开可用的序列数据库如 GenBank，MALDI-TOF MS 数据库是专属私用的。虽然用户可以通过向数据库添加代表性低或非典型的种类或菌株（包括种内变异）质谱信息，或者再次添加参考菌株谱数据库，提高某些低检出率菌株的鉴定率，但这些操作可能会超出某些实验室能力范围。因为低鉴定分数或百分比，10%的菌株可能需要重复测试[47]。生长在某些培养基上可能与低鉴定分数或百分比有关，且小的或黏液性菌落可能无

法鉴定[173]。有实验表明，新生隐球菌和格特隐球菌荚膜大小可以干扰 Bruker 系统的鉴定性能[174]。为了辨别鉴定关系密切的菌种，鉴定标准可能需要进行重新修正，能够将其与下一最好匹配类群区分开来。针对特定的微生物种群，选取属或种特异性的(包括更低的)截断值(Cutoff)或许比较合适。鉴定中，可能会出现一些失误，通常包括菌落接种至靶标板的位置错误、待测菌不纯、涂抹于(两)靶点间区域、靶板不洁净，以及在实验室信息系统输入错误结果等。将理想的菌量点样到靶板上是一个不断学习积累的过程[43]。虽然检测结果一般是可重复的，但许多因素会导致检测结果不稳定，包括质谱仪器、激光器寿命、基质和溶剂组成、技术人员、培养条件和生物可变性，质量控制策略不完善，仪器(如激光)和软件可能会发生的故障。最后，与所有鉴定系统一样，应定期更新分类方法。

四、基因型鉴定系统

DNA 靶向测序

对于纯培养的微生物可以进行 DNA 序列的靶向测序。为全面了解此内容，可参考该专业的文章和指南[175-176]。选择鉴定细菌和真菌的靶基因的理论基础是一些基因可变区之外有保守片段。靶基因的保守区往往是 PCR 引物和 DNA 测序引物退火结合的区域。可变区具有独特的核苷酸序列，从而实现基于测序的特定菌株属和种的鉴定。鉴定细菌最常用的靶序列是 16S rRNA 基因(16S 核糖体 DNA)，它是一个约 1500 bp 的基因，编码核糖体 30S 亚基的一部分。部分(500 bp)16SrRNA 基因测序常用于革兰阴性细菌、革兰阳性细菌、厌氧菌与分枝杆菌的序列鉴定[176]。对于部分 16S rRNA 基因序列高保守性的菌属，全长 16S rRNA 基因测序或其他靶 DNA 测序可能有助于鉴别鉴定。基于测序细菌鉴定的其他靶 DNA 序列包括 *rpo*B 基因(细菌 RNA 聚合酶 β 亚基)、*tuf*(延伸因子 Tu)基因、*gyr*A 或 *gyr*B 基因(促旋酶 A 或 B)、*sod*A(含锰超氧化物歧化酶)和热休克蛋白基因等。虽然其他靶序列在种属分辨上比 16SrRNA 基因更好，但由于这些序列不够保守，可能需要属或群特异性的 PCR 或 DNA 测序引物，且其能够利用的序列数据比现有 16SrRNA 基因要少。鉴定酵母菌和医学相关真菌的潜在靶序列包括内部转录间隔区域 ITS1 和 ITS2，它们作为可变区定位于编码 18S、5.8S 和 28S rRNA 的保守基因之间，以及 28S rRNA 基因的 D1～D2 区。

鉴定微生物用的 DNA 靶向测序结果与公开的(如 GenBank)和(或)私有的如 MicroSeq(应用生物系统，Calrsbad，CA)、SmartGene(Lausanne，Switzerland)和 Ripseq(Pathogenomix 公司，Santa Cruz，CA)等数据库的参考序列进行比对。通过比较查询序列和参考序列，两者之间存在的非匹配核苷酸数量将用来确定两者的相关性，最终的结果报告为序列一致性百分比。在属或种的水平，鉴定微生物界定的可接受序列一致性百分比的数值是不同的，这取决于 DNA 靶序列及微生物本身的特性。多数细菌的 16S rRNA 基因为多拷贝靶基因，一个微生物的 16S rRNA 基因序列若有变异，可能产生难以解释的序列数据。此时，名为 RipSeq Mixed (Pathogenomix 公司，Santa Cruz，CA)的计算机程序和数据库可以在算法上消除此类干扰。同时，有必要仔细评估核苷酸数据库的准确性、序列数据的质量、数据库更新的频率、软件、成本和待比对查询的核苷酸序列长度。CLSI 刊发了一份被广泛认可的共识文件，以指导 DNA 靶向测序技术在属和种的水平鉴定微生物。对即将或已经实施 DNA 靶向测序的实验室人员而言，这份文件是一份有用的指南手册[175]。未来全基因组测序在临床上将变得更为常规化，可为临床提供种多样性、毒力特性、流行病学、耐药机制及病因学方面的信息。虽然全基因组测序也可用于微生物种属的鉴定，但目前该方法的成本可能过高。除了鉴定分离菌株外，宏基因组鸟枪测序(metagenomic shotgun sequencing)技术还可用于检测和鉴定直接来源于临床标本的 1 种或多种微生物。

五、选择仪器的标准

当选择一种方法进行鉴定和药敏试验时，实验人员必须考虑一些重要的问题(第 6 章)。实验室主管和其他管理者应认真决策，并进行专家咨询。其中，关键的问题是如何在平衡实验室与病人利益的前提下采购新的系统。

解决了上述问题后，接下来是着手寻找合适的仪器或系统，以满足实验室和医疗的需要。一般而言，不可轻易采购未在同行评议文章中获得好评的新系统。实验检验人员可以向仪器制造代理商索取可靠的由同行评议标准的参考文章，这些文章可以证明该厂商提供的仪器有能力鉴定分离菌株的范围。这个阶段应要求厂商进行产品操作演示，以及就产品的占地空间要求、技术应用、人机界面操作性能、服务合同和操作人事相关的考虑(包括样本准备及仪器负荷量)等应与厂商进行详细的沟通。

同时，访问其他类似的实验室，了解他们对新系统的看法，询问他们是否会再次购买，以及仪器使用时出现故障的频率，系统从机械角度判断是否可靠等问题。这些对于是否购买该系统有着重要的参考意义。

实验室应选择一款已被充分评估的系统，其鉴定所在医院或实验室所见的常规与罕见细菌的总体准确率应超过 90%。与传统方法相比，该系统对通常分离的菌落鉴定精密度至少达 95%。

组合药敏试验的准确性和细菌鉴定试验的准确性一样重要，有时甚至更重要。本书第 72 章讨论了与仪器敏感性测试方法相关的问题。最后，随着临床微生物学实验室越来越多地使用自动化鉴定仪器，了解如何通过实验室信息化系统将自动化鉴定系统与其他自动化系统有机结合起来，亦显得至关重要(第 6 章)。

六、评鉴定系统性能验证

一些参考资料可以提供诸多有用的信息指导评估、核实与验证临床实验室中的试剂盒、试验和检测仪器等[177-182]。当实验室在使用一款鉴定系统时，必须证明该系统运行性能与制造商所描述的相一致[183-184]。其他实验室公布的通过可靠的科学方式评估的某系统健全报告可以为该系统提供第一手的仪器性能资料[177]。接下来，采购实验室必须提供本实验室内部验证过的合格的新鉴定仪器的性能证据，验证内容包括实验室使用该系统时的仪器测试准确度的相关记录等[179-182]。CLIA88 已为临床服务类的鉴定系统指定了相关的设置[185]。

虽然规模小的实验室可能不像大型实验室能够拥有较多的资源用于新鉴定仪器的测试准确性的验证，但无论实验室规模大小，对临床患者提供的检测工作都需要验证鉴定方法准确性及可靠性。采购实验室验证仪器系统的意义在于确保检验操作人员能够利用该系统获得可靠的检测结果，且其检测的准确性应与系统制造商描述或相关文献记载的相一致。实验室工作人员期望新的系统所获得的检测数据应与现有的系统或方法所得的数据能 95%的一致性，并在最终分析中，其一致性应不少于 90%。只有这样，才有可能得出新系统比旧的系统更准确的事实结论。

从 1998 年起，美国 FDA 不再对自动或手动的表型鉴定系统进行[510(k)]上市前评估，也不再接收或批准这些鉴定系统提供的需要符合 CLIA88 要求的质量控制操作方案。检验人员必须意识到他们正在使用的新的或改良后的鉴定系统组件是没有经过 FDA 审批的，因为现在这种审批已不需要了。这使得检验人员更加有必要亲自去检索寻求有关他们所选仪器的有效评价的文献和进行实验室内部的仪器验证，以确保仪器符合制造商所保证的鉴定指标。基于探针的检测装置和方法、核酸扩增和其他遗传学检测方法、MALDI-TOF MS 和商业仪器的药敏试验组件还将继续接受 FDA 审批。值得注意的是，FDA 要求 MALDI-TOF MS 系统制造商必须采用同分子方法一样的主要参考标准。这些 IVD 系统用户须明白这些检测鉴定皆属于未经 FDA 许可的微生物鉴别，因此，如果实验室已经确认并决定向临床发出检测鉴定报告，那么这些鉴定报告应注明 LDTs。

七、微生物鉴定系统的局限性

微生物鉴定系统的数据库必须经常更新，以涵盖不断涌现的新命名的种等信息。例如，如果阪崎克洛诺杆菌(阴沟肠杆菌色素突变株)未被添加入这些系统数据库，那么若只报道阴沟肠杆菌的鉴定结果，则阪崎克洛诺杆菌与新生儿脑膜炎之间的临床相关性将很可能被忽视。实验人员需要知道，每个鉴定系统的检测精准度是有限的，其受限于仪器系统自带的数据库版本，以及系统制造商提供的当前数据库也有可能是过时的。亦即，在频繁的菌属分类学变化过程中，更新数据库

未必总能提高属内新种的鉴定能力(如克洛诺杆菌属)[186]。因此,实验室应时时关注产品说明书的更新情况,同时若有不少异常微生物报告出现,应及时探究其可能的原因。

当鉴定检测结果出现问题时,如待检生物体出现异常生化反应谱,或是出现与预期不相符的药敏谱时,实验室程序手册必须规定采取必要措施解决此类问题。遇到这种情况时,必须采用备选方法进一步明确待检样本的检测鉴定谱,否则,该样本应送往相关参考实验室进行分析。

密切相关的种属可能难以或不可能使用某些系统来区分,但无法准确鉴别某属内所有种系的情况,对患者的诊疗效果也未必总会有负面的影响。例如,正确鉴别所有新发现的柠檬酸杆菌属在某些鉴定系统中可能难以实现。在这种情况下,因系统无法鉴别乌克曼柠檬酸杆菌所产生的对患者治疗效果的影响可能是微乎其微的,因为一份简单的"枸橼酸杆菌种"鉴定报告足以为患者的诊疗方案提供必要的数据参考。检验人员应认识到,当他们可能在处理一种潜在的或被怀疑是生物危险样本(如布鲁菌)的时候,实验室应遵循实验室应急反应处理规程,且禁止将这些生物危险样本用于自动化检测仪器,除非其中影响检验人员患病风险的因素被消除(见第15章"生物恐怖制剂")。自动化系统的用户应该意识到商业化产品的局限性,包括他们的前处理和其他替代试验的初步诊断推荐指南(http://www.asmusa.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines)。当出现疑似生物危害病原体时,应由公共卫生或参考实验室进行权威鉴定。

因病原体自身不断地进化及菌属分类学的不断修订更新等,检验人员应及时与产品制造商进行沟通,包括通过信件、通知公告及测试禁忌报告等方式来交流关于系统检测方法精准性的信息等,还可以通过已出版的文献来了解其他用户在使用这些鉴定系统时可能遇到的问题。同样,用户有责任报告系统或产品反复出现的问题,因为这些问题所导致的失真结果可能会给患者诊疗效果带来负面影响。

参考文献请扫二维码查阅

第 6 章 临床微生物学实验室的自动化和设计

CHRISTOPHER D. DOERN, MARTIN HOLFELDER

（孙立颖 译；胡志东、王辉 审校）

临床微生物学实验室（clinical microbiology laboratories，CMLs）对任何卫生保健系统的运营来说，都起着枢纽作用。根据其服务系统的类型，CMLs 可具有多样的形式。实验室设计没有唯一的正确方法，因为适当的设计取决于可用的空间、人员配备要求、提供的服务、测试量及许多其他因素。尽管实验室设计存在机构间的差异，但所有实验室都应考虑下面几个共同的元素。

第一，对工作人员和来访者来说，实验室应该是一个安全的环境。由于感染性疾病的诊断通常需要将病原体增殖到高浓度以用于鉴定，因此，微生物学实验室可以说是一个危险的环境。实验室应优化设计，以确保诊断过程尽可能有效、安全地进行。许多资料提供了安全运营和设计实验室的指导。美国 CDC 中心于 1984 年首次出版了《微生物学和生物医学实验室的生物安全》（Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories，BMBL）。尽管这份文件中提供的信息是咨询性的，但在某些情况下，法律法规要求实验室强制遵守这个文件[1]。已修订的第五版 BMBL 包含了不断出现的新型病原体[2]。对所有微生物学实验室的最基本的要求是，实验室必须满足生物安全二级标准。根据提供的服务和接触的病原体，CMLs 可能需要满足生物安全三级标准[2]。有关实验室生物安全的更多信息请参见本书第 13 章。

第二，实验室设计要求从初始处理到最终结果报告都能够有效地处理标本，而不会污染标本或培养物。随着中心实验室的模式日益普及，样品处理效率的挑战也不断增加。在这些模式中，外部机构把标本运送到一个独立地点即中心实验室，由中心实验室为这些机构提供检测。该模式有助于整合多余的资源，但有可能影响检测效率。设计实验室时，应该考虑到医院内部和系统内部运输的时间和方式，以便优化周转时间（turn around time，TATs）。

第三，实验室设计应结构灵活，可以适应新兴技术和发展的需求。

本章的目的是提供正确设计实验室的信息，应注意的是，每个机构对实验室的要求不同。微生物学正在快速发展，设施的空间和布局上的要求也是如此。本章分为两部分。第一部分重点是实验室设计和工作流程，这部分介绍了实验室设计的一些关键元素，包括一个实验室的布局（如检测地点）、分析前的考量、人员配置、工作流程、流程改进和临床影响；第二部分对临床微生物学专家而言是一个新的重要主题，即实验室自动化。笔者在说明历史观点的同时，也将讨论目前可行的实验室自动化选择方案和实施注意事项。

一、实验室布局

几乎所有临床科室都是实验室的服务对象。因此至关重要的是，要通过网络和实体渠道形式，将各部门与提供检测的实验室很好地联系起来。在医疗体系中存在多种多样的实验室信息系统（laboratory information systems，LISs）和电子病案系统。目前，这些系统成为实验室检测重要组成部分。随着数字化微生物学和实验室整体自动化（total laboratory automation，TLA）越发普遍，这些系统可能变得更加重要。有关各式各样的信息系统的综述不在本章的讨论范围。API 提供了一个可以用于评价现有 LISs 系统的工具包（http://www.pathologyinformatics.org/lis_toolkit.php）。

在任何一个医疗环境，特别是教学医院，能够方便地进入实验室是鼓励医生和实习生与医院实验室直接互动的一个重要因素。虽然很难量化这种互动的临床效益，但大多数微生物学家和感染科医生都认同的是：能够方便地进入实验室进行个人咨询是大有益处的。

显然，医院内设置能为其提供服务的实验室的确存在优势。然而，中心实验室模式同样具有显著的效益，其主要的优势是形成一个规模。将实验室服务集中化，虽然样品运输很烦琐，但节省了空间、技术和人力资源。通过集中服务，实验室可以将所有资源集中于一个独立区域，从而减少在外部实验室中维持多余的实验室基本设施所需的巨额开支。而且，在当今时代，实验室退休人员比入职人员多，人们很难找到技能精湛的专业人员[3]。在专业人士稀缺的地方，集中化管理使很多实验室可以利用非常有限的技术资源。例如，在美国，寄生虫病很稀少。大多数寄生虫引起的胃肠道疾病[由隐孢子虫(*Cryptosporidium*)和贾第鞭毛虫(*Giardia* spp.)引起的疾病除外]的诊断方法是显微镜检查虫卵和寄生虫。这种检测费时，且由于这些病原体的患病率低而难于保证技术人员的能力。因此，许多实验室意识到由于缺乏此专业知识，而不再在本实验室内部开展此类检测。据估计，美国近 60%的实验室将虫卵和寄生虫检查送往参考实验室[4]。

二、检测地点

实验室结构的传统模式是由被测物而不是测试方法来决定检测地点，现在这种模式受到了挑战。例如，现今许多感染性疾病的检测在临床生化实验室完成，或在急诊科床旁进行，而不是在 CML 进行。由于诊断方法不断简化，家庭检测可能变得更为普遍。

三、在化学和中心实验室进行的感染性疾病检测

技术不断发展，简化了操作步骤。以往在实验室的一个部门进行的许多检查项目，现在可以移至最方便的地点进行。这一现象的很好例子是简化了分子检测项目。像 GeneXpert(Cepheid，Sunnydale，CA)和 FilmArray(Biofire Diagnostics，Inc.，Salt Lake City，UT)这样的仪器，已经将分子生物学简化为只进行简单的标本处理。这类检测已没有必要由训练有素的分子生物学家来进行。这使医疗机构可以考虑将这些检测重新设置在实验室的某个部门，而这一部门之前并不进行此项检测。一些微生物学实验室并不是每天 24 h、每周 7 天(24/7)的工作方式，此时，这些"移动的(walk-away)"分子项目可以在必要时移至昼夜运行的实验室内进行检测。

决定床旁检测(point-of-care testing，POCT)的地点是一个颇有争议的过程。通常，微生物学家拒绝非实验室人员(如急诊科人员)进行 POCT 操作的请求。因为这些检测人员不能像经过培训的实验室人员一样，严格执行标准化操作和质量控制(quality control，QC)。另外，非实验室部门有时不能充分理解操作的复杂性，即使只是一项技术上不复杂的测试。当决定是否由非实验室部门进行 POCT 时，应当考虑到正确开具申请、结果报告、胜任力和能力验证，以及库存管理等工作。在条件允许的情况下，也需要建立一个严格的系统来监测检测项目的质量。除了这些实际问题外，管理方面也要考虑可以指定谁进行检测操作，以及可以在哪里进行操作。

实验室外进行高质量 POCT 操作的能力已改进很多，这得益于诸如 Liat(Roche，Indianapolis，IN)及 GeneXpert Omni(Cepheid)等仪器的应用。在某些情况下，可以将这些仪器编程用于质控封锁(QC lockout)、自动结果解释和自动结果验证。这些仪器帮助繁忙的工作人员适时地判读结果，并能自动发送信息到信息管理系统。质控封锁的功能在于，它强制操作人员进行正确的质控。只有进行了质控，且质控合格后，仪器才可被解锁。

美国微生物学会认识到 POCT 在未来感染性疾病的诊断中会起到重要的作用，他们发表了一份报告，概述了与 POCT 设备测试的相关问题[5]。报告回顾了特定病原体的检测技术，对成功实现 POCT 或"患者身边"检测提出了推荐意见。该报告还提供了监督这些检测的细节，并评估了这些检测设备在正式实验室环境之外进行测定时可能产生的潜在影响。

四、分析前微生物学

实验室工作中关键的一点是与客户的互动，包括以电子传递的方式开具申请、追踪标本和报告结果。其中，标本运送是最突出的一点。标本运送有3种主要方式：人工运送、气压管道运送和机器人运送。具有内部实验室的医院通常综合应用这3种方式，而大多数标本优先选择气压管道运送。对中心实验室模式（如商业参考实验室、为外部客户网络提供服务的医院）来说，标本运送是更大的挑战。要提供准确可靠的结果，高效地运送标本非常重要。当标本中存在不稳定的病原体时，构建较为理想的环境以保持微生物的存活，同时缩短标本运送时间至关重要。令人吃惊的是，很少有文献阐述标本运送时间的重要性，但本书第19章表19-1提供了相关指南。该表推荐脑脊液、血培养瓶、脓肿标本和体液标本从采集到处理要在2 h内完成[6]，但如果标本必须进行远距离运送，无论是跨越城镇或是全国，都不可能满足这些推荐的方式。因此，一些实验室对需要高度优先处理的标本（如脑脊液）进行接种和预培养，这样就可按常规时间间隔而不是急诊方式进行运送。保持微生物存活是缩短运送时间的重要原因，另外，高效地运送标本也可以更快地报告结果。

五、人员配置模式

CMLs最重要的资源是进行试验操作的人员。资料显示，此领域缺乏有经验的医学技术人员。然而，美国临床病理学会（American Society for Clinical Pathology，ASCP）在2014年公布了其2年1次的工资和职位空缺的调查情况，结果显示，与2010年的数据相比，职位空缺率略有下降。不幸的是，造成这种趋势的部分原因可能是由于实验室取消了他们一直无法填补的职位。2014年的ASCP调查报道CMLs的空缺率为5%，低于2010年报道的7%[7]。此外，另一份近期报道显示，自2012年以来，实验室空缺情况继续增加，部分原因在于实验室专业人员的退休率超过预期[8]。因此，工作单位采用多种不同的人员配置模式来优化他们的员工效率。

大多数实验室将工作日拆分成3个8 h的班次，这通常包括白班、傍晚班和夜班。另一个方案是“7上7下”或“8上6下”的模式，即员工连续工作7天或8天，每天工作10 h，然后分别休息7或6天。实验室多采用8 h和10 h班次相结合来满足工作量要求。

许多实验室安排大部分人员在第1班次进行大部分高复杂性检测，第2和第3班次的人员可以帮助完成白天的工作，但在许多情况下，实验室仅承担革兰染色和急诊实验室的功能。

对传统模式的替代方案是采用24/7的人员安排。采用这种模式的实验室人员被平均分配在全天的工作中，多次判读培养结果。这种模式的理念源自精益管理及6σ理论，经过分析发现一些培养结果可以在晚班和夜班来判读，到第2天早上才处理培养结果会引起不必要的TAT延长。在24 h人员配置模式中，初次判读培养结果在接种16～20 h后进行。实验室的工作台可因此按照判读的时间进行细分，而不是根据患者的姓氏或标本来源划分。

对这种方案的效果进行同行评议的文献很少。然而，至少有一个实验室分享了采用24 h进行培养判读的经验，结果显示，对于培养阳性的结果而言，TAT几乎缩短了24 h[9]；从中获得的其他益处是工作可以更平均地分布在全天内完成，早班的人员不会疲于应付积攒过夜的培养标本；并且，在人员配置和供应支出方面也具有一定的经济效益（J. Campos，个人意见）。

在实施24/7的培养判读模式时存在一些重大的挑战。一方面，实验室可能很难找到有经验的技术人员在晚班和夜班工作。在这些班次的员工流动率较高，很难保持有经验的人员在岗。同样，这些班次通常无人监管且没有医学指导。实验室需要确保其具有和白班一样处理故障的资源和指导。另一方面，还应考虑实验室改为24/7培养判读模式是否是职能过度。在夜班期间发放的结果对于门诊患者是否能起到作用？一项随机对照研究的结果显示其未发挥任何作用[10]。最后，在转换为24/7微生物学模式过程中，变更管理将成为一个重大的挑战。从传统模式转换成24/7模式时，实验室可能会遇到阻力。

六、员工培训水平

实验室人员可以具有不同的教育水平和工作经验，并据此来分配工作。医学技术人员(medical technologist，MT)，也可以称为临床实验室科学家、生物医学科学家或医学实验室科学家，一般需要获得医学技术、生物或化学学士学位；通过大学课程，并完成医院实习后可获得MT资格，有些州要求MT应通过考试获得执照；MT应能够胜任复杂的检测和分析，包括标本直接显微镜镜检、培养结果解释、微生物鉴定、抗微生物药物敏感性试验、高复杂性分子检测和监督管理其他人员；MT要了解实验室检测的基础科学原理，同样也要了解疾病的原因和试验选择的重要性[11]。

医学实验室技术人员(medical laboratory technician，MLT)是指可以理解实验室测试的技术和流程，并可以将检测与疾病过程联系起来，了解基础生理学，能识别异常检测结果的人员[11]。MLT执行的任务因所在机构的需求而不同，但大致包括质量保证监测、计算机使用、仪器故障处理，并且要了解标本采集和处理过程。ASCP声明，技师可以做与检测有关的技术决定，但应接受技术专家、主管或实验室主任监督。MLT通常要具有社区或专科学院或职业学校的大专学位。MLT可以通过附加的教育和工作经历而成为MT。

医学实验室助理是接受在职培训的人员，可以具有专业教育，但并非必需。医学实验室助理的主要任务是标本处理和使用分析前系统。这些专业人员必须具备标本可接受性的深入知识。

七、工作流程

(一)批处理与即时检测

工作流程的组织、批处理程序的选择和范围取决于几个因素。具有直接诊疗意义的标本可以仅在有限程度上进行批处理。当分析过程自动化达到一定高度时，标本可以合并成更大规模。实验室必须确定批处理对TAT的影响并考虑周全，同时也要确定医生何时可以获得检测结果。当以上条件均满足时，可以根据标本数量、标本类型、运送时间、标本到达实验室后的分配、需要进行的检测，以及用于检测的实验室设备来决定理想的批处理量大小。另外，还要考虑到因申请录入系统或结果数字化传输方式不同而产生的影响。

使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析(matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry，MALDI-TOF MS)和分子方法用于微生物鉴定可以缩短TAT[12]。MALDI-TOF MS鉴定只需要初代培养的1个菌落，很少需要次代分离以获得纯培养物。因此MS有可能比采用表型分析方法(phenotypic methods)早1～2个工作日完成细菌鉴定[13-14]。改变培养皿判读间隔可以进一步缩短TAT。培养皿也可以在下午和(或)晚上定期判读，而不是只固定在一个时间(传统上是在早晨)。这特别适用于在下午或晚上送达实验室的标本。根据上述判读形式批处理标本和配置人员可使实验室效益最大化。

在诊断微生物学中引入数字影像处理为制定工作流程和缩短TAT提供了新的机遇。通过数字化判读平板可以更早地识别菌落的生长，加快了后期的鉴定和药物敏感性试验。在每个使用者确定的时间间隔及进一步处理的时间节点，均可获取平板的照片。计算机可以在初步筛选培养阴性的平板方面提供支持，而培养阳性的平板会送至后续的诊断流程。影像学技术甚至可以检测到肉眼很难分辨的最小的菌落。显色培养基尤其适用于这种技术，可以更早地记录培养的结果。这些培养基用于诊断抗生素耐药的微生物，如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*，MRSA)、耐万古霉素肠球菌(vancomycin-resistant *enterococci*，VRE)、多重耐药的大肠埃希菌、不动杆菌属及沙门菌属[15-16]。实验室应该考虑依照上述流程而调整工作时间。数字影像处理也可以应用于人工接种的平板。按照上述流程批处理标本可以充分发挥自动化的优势。

简单易行的分子诊断检测系统快速发展，这导致了批处理规模日渐减小。这些系统用于检测诸如MRSA、艰难拟梭菌(*Clostridioides difficile*，以前称为*Clostridium difficile*)、肠道病毒和

呼吸道病毒等病原体。分批处理标本可能会影响这些系统发挥其节省时间和易于操作的优势。

(二)流程改进的作用

经济上的压力及实验室自动化方面的新技术,为重新思考整个实验室流程并进行可能的修改提供了新的契机。

实验室流程改进的潜在领域广泛,从分析和解决实验室现况(工作流程、人员配置、方法选择),直至全新的实验室概念和设备的引入。这些领域的改变可提升实验室内部的能力和灵活性,使之能够应对标本量的增长。评价整个实验室组织结构的另一个原因是要弥补实验室劳动力日渐减少造成的影响。

流程的改进应采取如下步骤以达到持续的优化。①编写一份实验室流程清单;②起草实施计划,这份计划应描述每个步骤,包括必要的资源、组织、生产率、目标 TAT 和处理额外工作的方法。通过有规律地密切追踪已实施的改进,监督并确定其是否已达到目标,实现新流程的可持续性。

整个流程的前期阶段是获取综合信息,包括参观其他实验室并与同行进行交流,也可以寻求外部咨询公司的建议。这些公司了解 CML 的复杂性,以及各类患者、检测项目组合和人员限制可能对流程的影响。用于诊断目的的医疗器械生产商也需要提供意见,从总体上对实验室设备进行基本评价和分析,包括工作组织和工作流程、设备的存储、计算机系统及其应用。所提出的解决方案通常导致自动化程度进一步提高,通过应用可能推荐的中间软件,更好地协调设备和流程。在这种情况下,实验室要采用不同方法进行过程分析和优化。相比那些与临床微生物学没有特别联系的咨询团队,这些公司要对 CML 有更深的理解。这些方法来自于汽车和造船工业,是以精益管理和 6σ 理论为基础的。

精益管理(lean management)方法起源于汽车工业并首先应用于丰田公司,其目的是确定所有可以提升公司价值和提高客户满意度的特征。同时,终止多余的活动和流程。医疗卫生行业的精益管理可以概括为以下 4 个方法:①用于分析流程并由此发现和分析问题的方法;②更有效、高效地设计流程的方法;③更好地发现错误、予以解决并预防有害影响的方法;④处理这些变化和问题的方式,以及使用科学手段发现解决之道的方法[17]。

下面是应用 5S 概念完成精益管理的实例:①分类(sorting)——只有非常必要的材料才允许放入工作区域;②整理(straightening)——清理整个实验室区域而且将每件工作设备放置在指定地点;③清洁(sweeping)——定期系统地清洁工作区域;④标准化(standardizing)——将实验室内流程标准化;⑤持续(sustaining)——通过定期评价和分析这些流程实现可持续性。

6σ 方法的目的是减少流程中的变异,同时将分析中的误差和偏差减少到最小。这是通过实施将工作人员、工作流程、质量要求、责任和成本联系起来的控制机制来实现的。日本在 20 世纪 70 年代将此方法用于造船工业,目前已在全世界范围内广泛应用于其他工业。6σ 是一种基于统计学、用于质量提升的管理方法,其目标是提高组织成效和用户满意度。最常用的 6σ 方法是所谓的 DMAIC 循环:定义(define)、测量(measure)、分析(analyze)、改进(improve)和控制(control)。使用 DMAIC,流程成为测量变量,这个变量可持续改进。σ 值描述了错误预期发生的概率。最好的 σ 值是 6,这表示每百万机会预期发生低于 3.4 个缺陷或错误(DPMO)。实验室流程中 σ 值为 1,意味着每百万次检测分析预期发生 691 462 次缺陷。实施 6σ 的实验室能够将其 σ 值从 3.9(7210 DPMO)提高至 4.5(1387 DPMO)[18]。

上述各种方法可以采用不同的组合方式来改进实验室组织,这是优化流程和实现高级自动化的一部分。许多文献围绕此主题阐述医疗卫生行业的各部门如何成功应用这个流程[17,19-26]。Rutledge 等证明,在临床实验室实施精益管理和 6σ 后,技术人员步行模式下降 70%,肌酐项目、全血细胞计数、尿分析和离子钙的平均 TAT 减少 50% 以上[19]。Persoon 等使用来自丰田公司的精益生产系统,改进临床化学实验室的分析前流程[27]。分析前过程所用时间的中位数从 29 min 下降至 19 min。总之,这些流程改进系统保证增加人员效率,减少成本和错误,其最终目的是改善患者预后。本书第 2 章提供了涵盖实验室认可和合规方面的更多信息。

八、实验室自动化：历史观点

在过去的30年中，微生物学实验室在自动化方面的改变微乎其微。传统上微生物学是一个非常依赖手工的学科，不过这个领域正稳步经历一个向自动化的转变过程。尽管临床生化实验室早已在20年前就采用了TLA，但微生物学领域接收这个概念的速度很慢[28]。造成临床微生物学实验室自动化进程延缓的原因有以下几点。

第一，微生物学标本的复杂性阻碍了TLA解决方案的发展。临床生化标本的量和性状相对统一，也许更重要的是，这些标本采用了标准化的容器进行采集。这些因素有利于自动化，而CMLs接收的标本与之形成鲜明的对比。CML必须能够处理和分析用不同容器进行采集的不同类型的标本。

第二，诊断感染性疾病的本质因临床表现的非特异性而变得复杂，因此，诊断过程必须包括对大量病原体的诊断。诊断过程必须能检测很多不同的病原菌，而自动化平台必须能够适应这个现实。虽然目前培养结果的解释仍需要人为判断而不能自动化，但人工智能程序总有一天能够将需要微生物学技术人员做出的复杂解释重现出来。

第三，成本是自动化引入临床微生物学实验室的重要障碍。相对于生化检测，微生物学的标本量少很多这减少了自动化需求，而且投资后的回报较少而无吸引力。然而，标本量大的中心实验室模式越来越常见，其对自动化来说可能是一个有吸引力的环境。这些系统如何适用于较小的实验室仍有待确定。

九、现有的微生物学实验室自动化系统

(一)微生物鉴定和抗微生物药物敏感性试验

微生物学专家在进行微生物鉴定和抗微生物药物敏感性试验方面有许多不同的选择。有关抗微生物药物敏感性检测系统的评价详见本书第74章。MALDI-TOF MS是一种基于蛋白质图谱和数据比对的微生物鉴定技术。实际上，这些系统是半自动的，在进行分析之前一般需要重要的手工处理。用于质谱法微生物鉴定的2个主要平台是Vitek MS(bio Mérieux)和Biotyper(Bruker Daltonic Billerica,MA)。这些在本书第5章有更为详细的讨论。

(二)分子自动化

传统的分子生物学是烦琐和耗费人力的过程，需要经验并谨防污染。未来的分子生物学将会大有不同，因为手工分子流程目前正在进行自动化并整合到一个系统中。这些系统通常称为"从样本到答案(sample-to-answer)"或"移动的(walk-away)"。除全自动系统外，一些生产厂商还提供自动化核酸提取平台。对每个产品的逐一探讨不在本章论述范围内。

本书第7章阐述了自动化分子检测平台。

(三)自动化标本处理

近年来，临床标本的自动化接种一直是研究和开发的核心[29]。这些设备已经上市了一段时间。微生物学标本处理自动化系统改进了划线操作的质量、避免交叉污染、减轻人体工程学方面的不足并降低标本处理时间和成本。自动划线处理具有可重复性并确保形成单个菌落。这减少了为鉴定和抗微生物药物敏感性试验而必须进行传代分纯的次数。人们已经对现有的设备进行了评价[30-33]。自动化接种系统通常处理液体运送培养基中的拭子，诸如E-Swab(Copan Diagnostics, Murrieta,CA)、Pur Flock (Puritan Medical Products, Guilford, ME)及Sigma swab(Medical Wire,Wiltshire,England)。这些拭子由开孔聚氨酯泡沫尖端和改良的Amies培养基(Sigma swab)或带有Amies培养基的尼龙植绒拭子(E-Swab和Fur Flock)组成。这些系统显著地改进了将微生物从拭子转移到运送培养基的过程，并使得革兰染色检测微生物的效果更好[27,34]。在固体或半固体运送培养基中的拭子只能在半自动设备中处理。现有自动化接种设备按照接种技术的不同划分为接种环或珠子技术。表6-1对自动化接种系统进行了比较，内容涉及处理的标本类型、加载标本的能力、根据划线模式处理的标本数量、接种平板的数量，以及载玻片和肉汤培养基的应用情况[39](译者注：此处引文有误)。最新的接种仪器

表 6-1 自动化接种系统[39]（译者注：此处引文有误）

特征	InoqulA FA/MI(BD-Kiestra B. V., Drachten, The Netherlands)[a]	WASP(Copan Italia Spa, Brescia, Italy)
标本类型	液基标本，尿(FA)；拭子标本，非液体标本(MI)	液基标本，涂片，痰，粪便
加载标本的最大容量	6 个架子加载 270 个	12 个架子加载 72 个
存放的平板数量	1836 个平板	324～378 平板
存放的肉汤数量	5 个架子 45 支	4 个架子 12 支
不同培养基的数量	12	9
标本离心	无	可以
需要附带的耗材	吸头，珠子	无
肉汤接种(接种量每 ml)	可以(10～250 μl)	可以(1, 10, 30 μl)
接种技术(体积)	珠子(10～250 μl)	接种环(1, 10, 30 μl)
同时划线的平板数量	1～5	1
每小时处理的标本数量		
接种尿标本，模式 1 平板划线	78	180
接种尿标本，模式 1 平板划线＋1 份玻片制备	39	90
三区划线，模式 1 平板划线	78	140
三区划线，模式 1 划线 3 个平板＋接种 1 个肉汤培养基	41	40
三区划线，模式 1 划线 3 个平板＋接种 1 个肉汤培养基＋1 份玻片制备	28	25

注：[a]FA. 全自动；MI. 手工交互

已经进行了评价。已不再销售的 Previ Isola 系统相比于手工接种方法能明显检测出更多的弯曲菌阳性的粪便标本（2010－2011 年增多 32 例，2007－2008 年增多 19 例，2008－2009 年增多 10 例）[33]。对 Copan WASP 系统和 BD Kiestra InoqulA 系统[32]的比较研究表明，与 WASP 相比，InoqulA 在接种尿样本方面具有更高的准确性和更高的菌落分离数量。需要更多的研究来评估实验室自动化系统处理其他临床标本的质量，如粪便样本、呼吸道标本和伤口拭子。

1. InoqulA＋FA/MI 系统 InoqulA＋(BD-Kiestra)FA/MI 系统（全自动/手工交互作用）可以在 FA 模式处理液体培养基，在 MI 模式下处理拭子或其他类型的标本。条码贴在平板的侧面。在 MI 模式中，将拭子或待接种的材料手工放置在琼脂平板上，划线和 FA 模式一样采用磁珠进行操作。在 MI 模式下制备涂片。处理过程可以在 MI 模式或 FA 模式下进行，但是不能同时采用 2 种模式。在 FA 模式中，系统自动将标本振荡、去帽和再盖帽。1 个磁力滚动珠子用于划线，系统最多可同时接种 5 个单碟或双碟平板。划线形式（图 6-1）既可以从各种模式中选择，也可以针对每个材料由用户自定义。接种好的平板可以预分类到 4 种不同的孵育箱内。此系统配备一个高效空气过滤器（high efficiency particulate air filter, HEPA）滤膜系统。手工交互模式的接种操作可以在生物安全柜内进行。

2. WASP 系统 WASP（walk-away 标本处理仪，Copan）可处理不同的标本类型。系统自动将标本去盖、再盖帽、振荡或离心。342～370 个单碟和双碟平板储存在多至 9 个平板仓内，每个平板仓只能选用一种平板。划线模式（图 6-2*）可以从各种选项中选择。接种环采用加热灭菌。环的接种量采用拍照方式记录。1 个琼脂平板可以接种 2 个标本，每个标本接种半个平板。接种好的平板按照种类进行分类。平板的侧面或底部贴有标签。系统可配置革兰染色涂片制备、接种增菌肉汤和抗微生物药物敏感性试验所需的抗生素纸

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图



图 6-1 InoqulA＋ 接种的平板(显色培养基;尿道致病菌显色培养基),见彩插

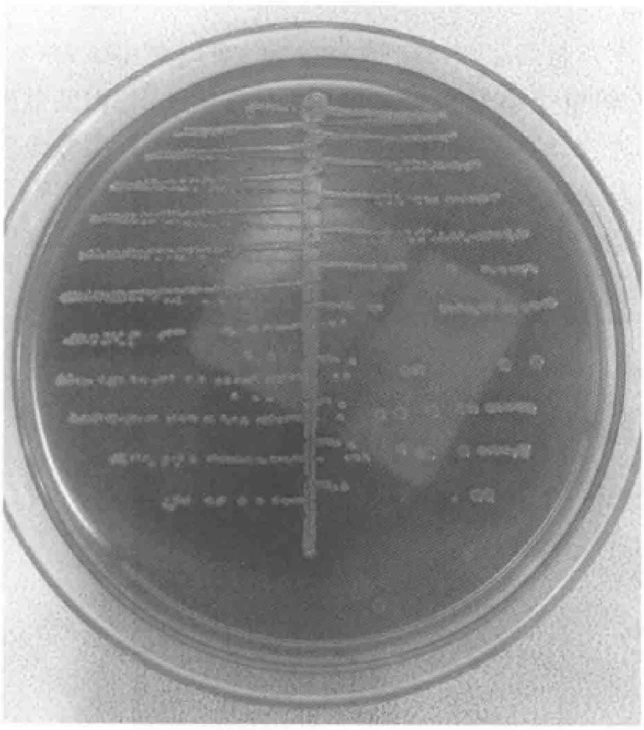


图 6-2 WASP-inoculated MacConkey agar plate (*E. coli*)

片分配器。培养后的平板可以再放入 WASP 中用于纸片扩散法抗微生物药物敏感性试验。该系统配备有一个 HEPA 滤膜系统。

十、实验室整体自动化

在微生物学中实现实验室整体自动化的目的在于改进质量、缩短结果报告时间、更好地处理日益增加的标本量、弥补实验室人员的不足,而且更具有经济效益[35-37]。例如,在 TLA 解决方案中安装 WASP Lab 系统可以节省相当于 1.2 个全职工作人员的时间[38]。

目前,有 BD-Kiestra 和 Copan 2 家公司提供了不同的微生物领域 TLA 解决方案。此外,i2a(蒙彼利埃,法国)正准备推出 Recitals 系统。该系统由传输器连接,包括平板划线装置(Prelude)、一个用于堆放平板的中间传送带,以及一个传送带用于转运人工划线的平板或仅用来判读的平板。系统连接了一个数字孵箱。在需氧和二氧化碳环境中,孵育箱有 64 个隔间,可容纳 960～1024 个平板。Prelude2 系统进行平板的准备,以及玻片、肉汤、试管和 MALDI-TOF 质谱靶板的处理,也能进行抗微生物药物敏感性试验。根据制造商的描述,它包含 3 种平板划线的方式,接种环、移液管和拭子。每小时可处理 200 块平板。该系统包括一个二级生物安全柜。

该领域发展迅速。在不远的将来,预计会有更多的方法和设备实现自动化。

(一)BD-Kiestra TLA 概念

BD-Kiestra TLA 概念(BD-Kiestra TLA Concept)是一个由传输器连接的系统(BD-Kiestra WCA)(图 6-3*)。这个系统包含如下工作步骤:使用 InoqulA＋系统接种液体标本、拭子和其他非液体标本,在需氧和二氧化碳气体中孵育及数字成像。每个孵育箱的容量是 1152 个平板。平板独立地存贮在孵育箱内。在最近的国际微生物学会议上,提出了一种初步模型,可以在 MALDI-TOF MS 鉴定时自动挑选菌落并可以自动进行抗微生物药物敏感性试验。它可以连接 BD 凤凰 M50 自动微生物系统(Becton Dickinson,Sparks,MD),计划扩展连接分子诊断仪器(BD-Max;BectonDickinson)。系统装置实际尺寸和容量可

*译者注:原著引用其他著作图,未经原作者授权翻译,故此保留原图

实现个体化定制。采用这种方式，实验室可以逐步达到全部自动化并能适应未来的发展。图 6-4* 和图 6-5* 为安装后的 BD Kiestra TLA。

值得注意的是，一些实验室报告说 TLA 系统产生了明显的噪音。虽然没有数据客观地说明这是一个重大问题，但与用户的个人交流表明，噪音在某些实验室配置中可能是一个问题，在其他实验室则不是。造成这样的原因尚不清楚，但很可能是由于实验室之间音效的差异。

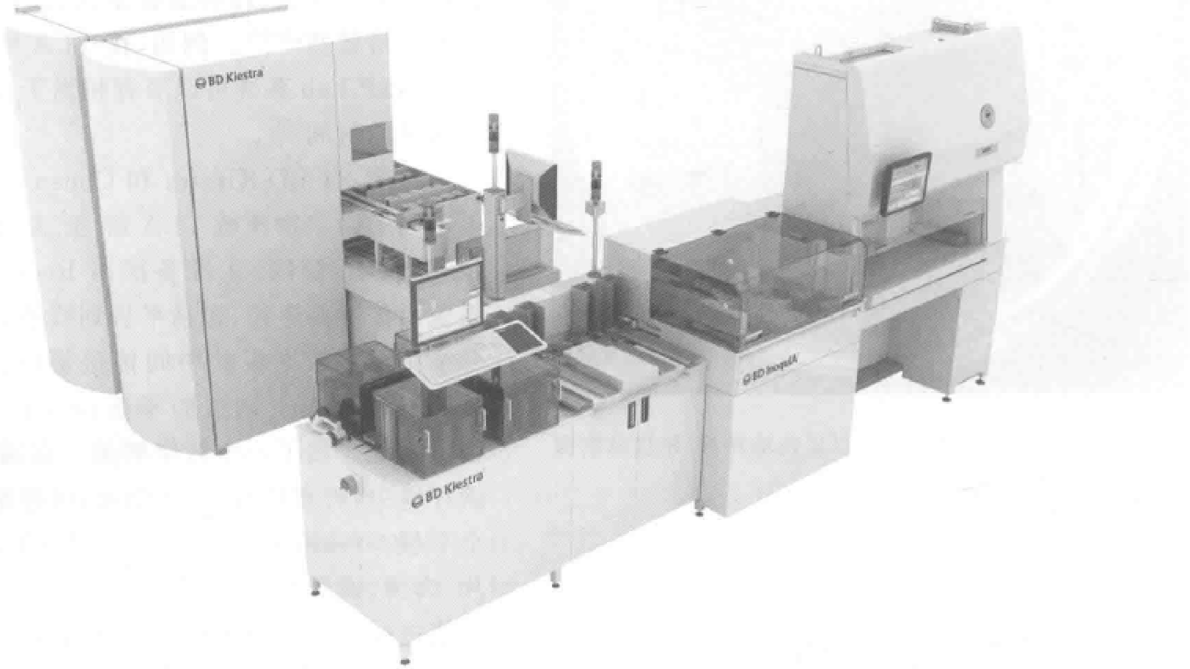


图 6-3 BD-Kiestra WCA (depth, 436.8 cm; width, 443.4 cm; weight, 2,635 kg)



图 6-4 Installed BD-Kiestra TLA unit with one InoqulA, five ReadA Compact, and seven workbenches, installed at Bioscientia Labor Ingelheim, Ingelheim, Germany

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

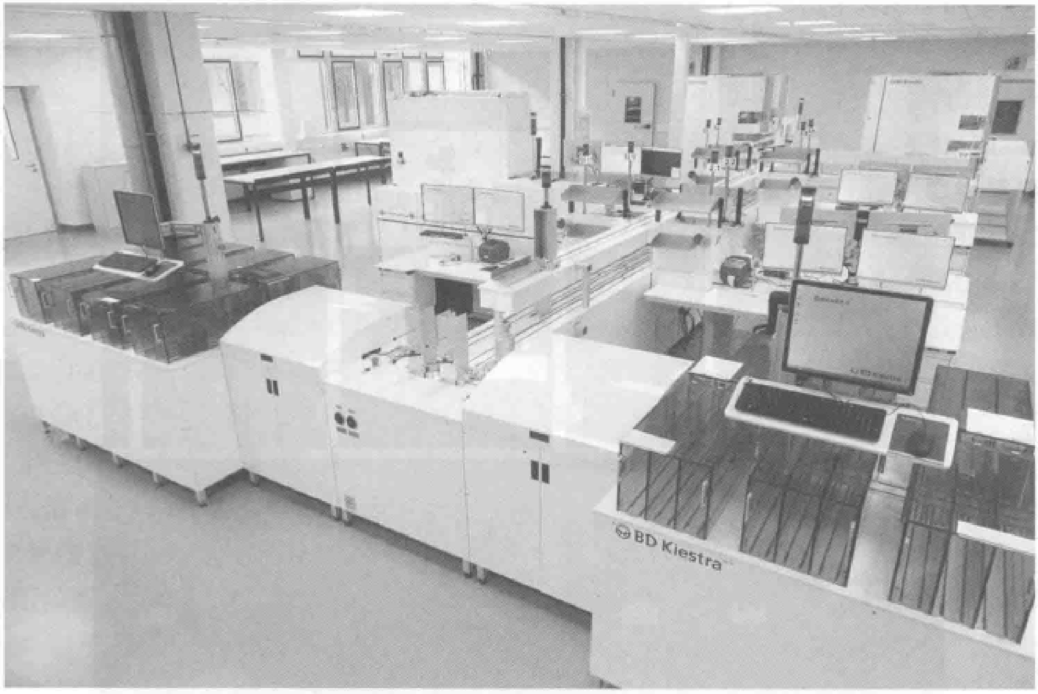


图 6-5　Installed BD－Kiestra TLA unit

(二)WASP 实验室概念

WASP 实验室(WASP Lab)(Copan)是一个模块结构(图 6-6),通过传输系统连接每个仪器。这个系统可处理涂片、痰、粪便及液体标本。它包含 WASP 样本处理系统、在需氧和二氧化碳气体中孵育及数字成像。一个孵育箱的容量是 854～1708 个平板,采用单个平板定位。该系统包括一个自动挑选菌落的系统(Colibri)。Colibri 系统(图 6-7)可自动制备 MALDI-TOF MS 靶板和用于抗菌药物敏感性试验的菌悬液。它能够处理次代培养和纯化平板。Colibri 系统通过数字成像接收 WASPLab 的信息。图 6-8* 显示了一个安装在临床实验室的 WASPLab。

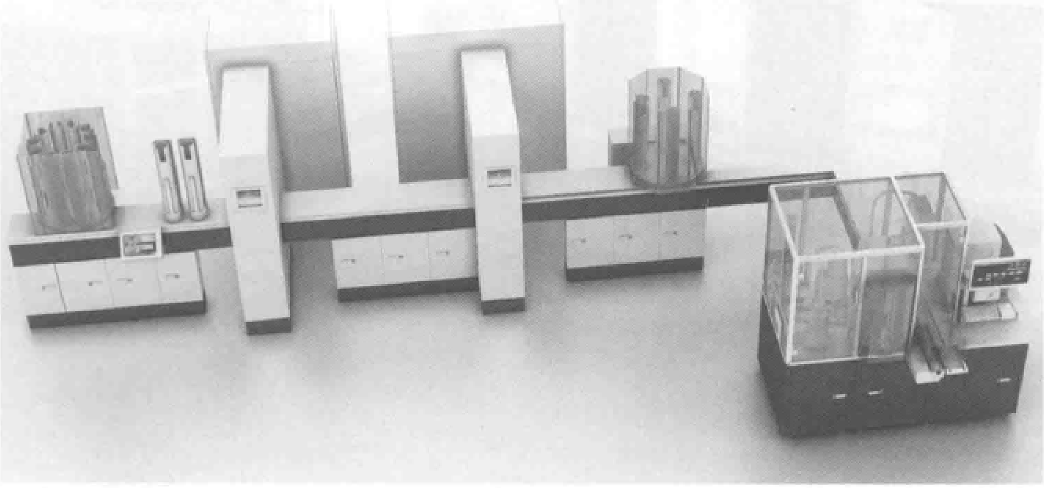


图 6-6　WASPLab 系统(Copan)包括 WASP(深度:79.0 cm;宽度:194.9 cm;重量:720～740kg),双孵育箱(深度:83.0 cm;宽度:173.8cm;重量:875kg),成像系统(深度:121.3 cm;宽度:37.5 cm;重量:300 kg),见彩插

*. 注:原著引用其他著作图,未经原作者授权翻译,故此保留原图

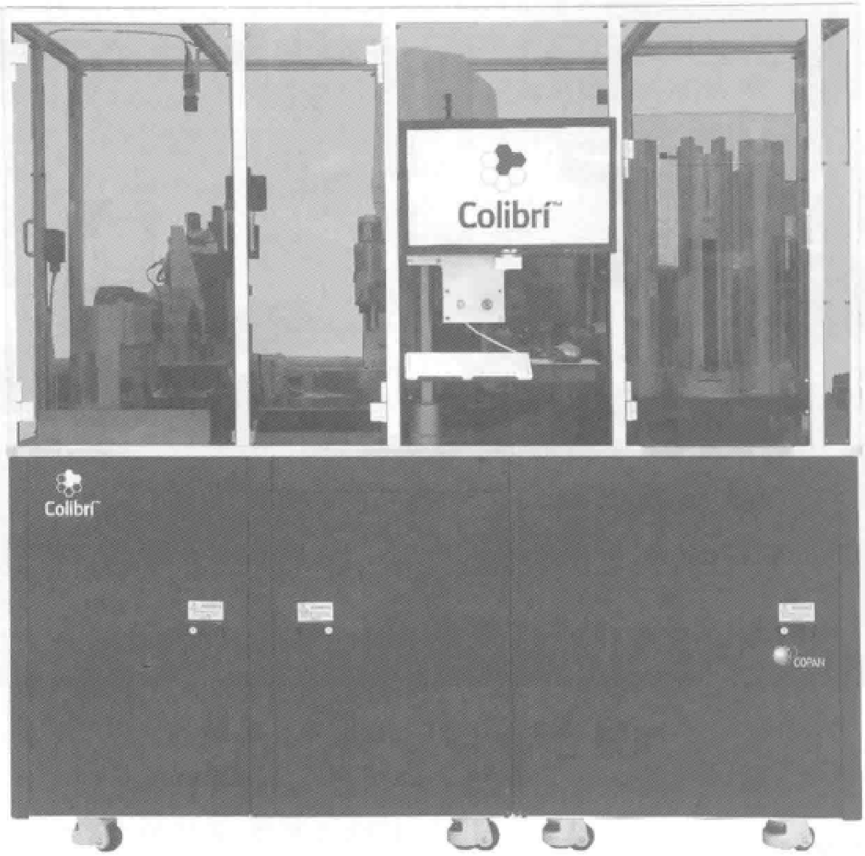


图 6-7 WASP Colibri(深度:79.0 cm;宽度:193.0 cm;重量:780 kg),见彩插

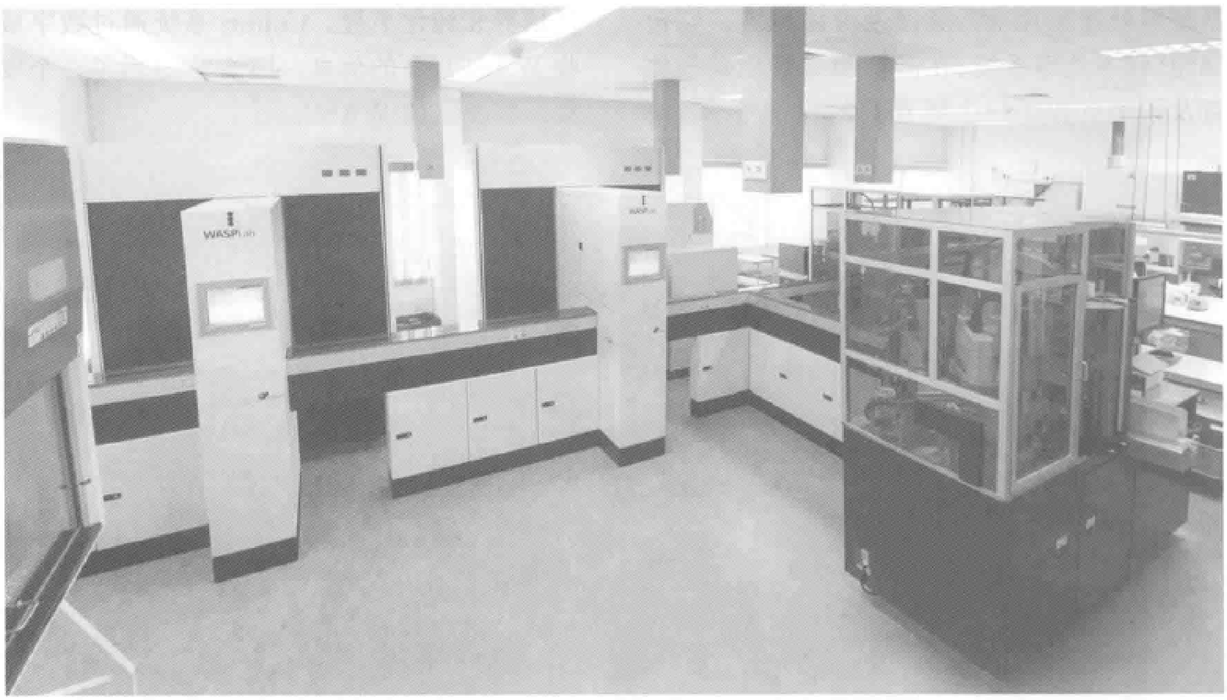


图 6-8 Installed WASPLab with 2 WASP, 2 double incubators, and 10 work benches, installed at Stichting PAMM Laboratorium Medische Microbiologie, Veldhoven, The Netherlands.

十一、数字成像

数字成像(digital imaging)是 TLA 的一个核心组成部分。由于所有生产厂商依照相似的图像评估原理,在此仅综合概述一下这些方法。数字成像软件的设计目的是模拟和改进目测评估微生物生长。每一个系统(BD-Kiestra 及 Copan)均能够采用数次曝光并在不同的角度给平板照相。随着数字成像与 MALDI-TOF MS 质谱鉴定自动化的结合,需要手工处理的平板百分比大大减少。在每个系统中,细菌的菌落可以在屏幕上标记出来用于进一步处理。数字处理有助于细菌生长的早期检测,缩短鉴定时间。拍摄图像的频率为每小时 100～300 幅平板照片不等。这两个系统使用不同的算法来检测早期生长。WASP Lab 将接种时拍摄的图像与孵育期间不同时间拍摄的图像进行比较。BD-Kiestra 算法基于信噪比或像素比[37]。如果不及时处理图像,菌落就会进一步生长,并可能生长在一起。这可能导致错误的鉴定和抗微生物药物敏感性试验结果[39]。系统依照某种标准(如生长或不生长)来自动作判定。此外,采集自同一个患者的所有标本,如尿、痰和多重耐药微生物筛选标本,可以在计算机辅助处理下同时进行评价。最后,图片可以归档并在日后用于培训或质控计划。Faron 等证明了 MRSA 和 VRE 的显色培养基的自动化数字分析(Copan WASP Lab)的性能[15-16]。使用数字软件检测 MRSA 的敏感性和特异性分别为 100% 和 90.7%～92.4%[15];对于 VRE 的敏感性和特异性分别为 100% 和 89.5%[16]。作者没有发现假阴性的平板。MRSA 的假阳性结果是由与阳性标本无关的轻微色素沉着引起[15]。VRE 最常见的假阳性结果是由于使用 VRE 显色培养基时存在残余基质或酵母[16]。表 6-2 总结了 WASP Lab 系统和 BD-Kiestra WCA TLA 系统的特点及全球实际安装的数量。

需要进一步的研究来评估数字成像在 TAT 和抗生素治疗中的作用。

表 6-2 BD-Kiestra WCA、TLA 及 WASPLab 系统的特征

仪器	孵育箱容量(平板数量)	气体环境	平板装载及成像时间(平板数/小时)	成像系统	光源/背景	配置	已安装的单元数量[a]
WCA; TLA(BD-Kiestra B.V., Drachten, The Netherlands)	1152	需氧,二氧化碳	300	2700 万像素	顶部,底部,侧面/黑白	WCA: 1 个标本处理器,1～3 个孵育箱,用可能的软件整合工作台 TLA: 1 或 2 个标本处理器,1～6 个孵育箱;1～12 个整合的工作台	InoqulA: 74 WCA: 35 TLA: 65
WASP Lab(Copan Italia Spa, Brescia, Italy)	854～1708	需氧,二氧化碳	250	2700 万像素	顶部,底部/黑白	1 或 2 个标本处理器,1～3 个孵育箱;用可能的软件整合工作台	WASP: 476 WASP Lab: 65

注:[a]WASP Lab(译者注:原文此处少写 WA)、BD Kiestra WCA 及 TLA,数据截至 2017 年 10 月

十二、系统的局限性

上述自动化系统的优势在于处理标准化和非复杂性的标本。那些需要特殊处理的标本,如器官或组织活检物,不宜采用这些系统。然而,采用液基标本(liquid-based specimen)转运系统大大扩展了自动化处理的可能性。这有效地将大体积标本及拭子转换成可用自动标本处理器处理的液体标本[34-35,40-41]。

对于小实验室,高度的灵活性和系统的兼容性是必需的。自动化系统的模块性质可以使实验室达到不同水平的自动化。如同前述,模块自动化和流程改进相结合保证了当前自动化系统的可扩展性,不受实验室大小的影响。因此,对小型实验室来说,自动化的成本可能不会超过其效益。所述系统的优点和缺点见表 6-3[42]。

表 6-3 TLA 的优点与缺点[42]

优点	缺点
改进了工作流程	呼吸道标本、活检、血液培养等标本接种困难
产生单个菌落的标准化划线	当 TLA 发生故障时，所需的备件昂贵
减少错误	存在污染的危险；需采取强制性卫生方案
图片文件具有重现性	每年需进行两次 1～4 个工作日的设备维护
减少了重复性任务	工作人员会失去微生物专业经验
使用条码管理	缺乏训练有素的员工可能会被迫应用自动化
减少了 TAT，从而改善患者护理，降低治疗成本	成本节约和投资回报取决于投入的金额、服务成本、工作流程优化及减少实验室人员加班

十三、自动化系统的评价和选择标准

在选择自动化系统之前，应评价实验室的常规工作。必须收集标本数量、标本达到时间及工作流程方面的数据，以便与有意向的厂家协商未来实验室的设计。如有可能，建议单位对其他机构已安装的自动化系统进行全面评价，确定每个系统是否能够满足实验室的需求。各类实验室人员应该参与到计划中。应将他们的建议和想法整合起来，为今后必须要做的改变提高总体支持率。目前，有许多文章提到这方面的问题[35-36,43]。

选择自动化系统时应该考虑的因素概括如下。

（一）生产率及产量

自动化系统的生产率根据处理的标本量和整个分析过程所用的 TAT 来决定。生产率受许多因素影响。必须考虑到标本类型和每份标本接种的平板数量。呼吸道标本、尿、伤口拭子、泌尿生殖道标本和筛查多重耐药菌的拭子需要接种不同种类的培养基[44]。生产率还受选择的划线方式、数字成像系统照相的次数，以及接种单碟还是双碟的影响。

（二）可靠性、稳定性和耐用性

应使用可显示系统可能出现故障的指示器。根据制造商提供的信息，应对系统可能出现的故障提前制定应急计划。应考虑对系统进行一定次数的检测和维修，并安排特定时间持续进行，并且安排可以在周末和假期为系统服务的人员。

（三）技术因素

在开始阶段，调研建筑物并决定房间的内部结构；计算所需要的空间和仪器的重量；确定电源，必要时包括压缩气体的出口。目前，设备和系统的体积在不断减小。必须考虑到实验室将来的发展。还要考虑到整合更多的附加设备，如 PCR 设备，挑取菌落的仪器、包括 MALDI-TOF MS 在内的鉴定及药物敏感性试验的仪器。

（四）软件应用

仪器应该通过双向界面与 LIS 连接。有可能需要使用中间软件。将中间软件与 LIS 协调起来至关重要。需要时，应整合其他厂商的仪器。

（五）安全与卫生

自动化标本处理系统应该是封闭的并采用适当的空气过滤系统，如 HEPA 滤膜。实验室必须考虑污染的风险，应建立对孵育箱和传送带的清洁和消毒方案，还要考虑到职业健康和安全制度。目前尚无关于实验室自动化安全方面的法规和指南。实验室要特别关注当自动化孵育系统出现故障时产生的暴露污染。

（六）质量控制和科学方面

整个系统应纳入质量管理程序。必须监督个人的工作步骤是否遵守实验室规定：包括从读取标本和平板上的条码，到接种和传送平板、数字成像处理及废物处理。接种系统应该确保可以检测到标本中的颗粒和气泡，以避免假阴性接种。应确保具有防止标本换位和交叉污染的措施。已发表了一项有关自动化系统交叉污染评

价的研究[31]。在这项研究中，无菌的和接种有大肠埃希菌的 Vacutainer 管与 E-Swab 拭子管交替放置在 WASP 系统中。从无菌标本中未观察到菌落。

(七)成本

实验室考虑的不仅是购买设备所需的资金，还要考虑其耗材(如移液器、梳子或珠子)。接种设备至少要 20 万美元。TLA 的费用因国家而异，但可能超过 200 万美元。可能有必要从不同的厂家购买琼脂平板和肉汤。更换琼脂培养基常常导致需要自动化平板划线装置重新编程，这可能导致额外的成本。工作流程的改变可能导致不同班次人员需求的改变，如果现在没有夜班，则有可能需要设立夜班制度。当评估投资的潜在回报时，这都必须要考虑。此外，还必须包括服务、维修费用和界面接口的成本。服务协议的年成本可能超过原投资的 10%，实验室中可能的结构改造也应该放入资金计划中。

(八)最后的决定

选择实验室自动化的类型和范围是由个体化情况和可用的资金来源决定。诊断医学微生物学经历一个如此巨大的革新浪潮已经有很长时间了。因此，有必要考虑在微生物鉴定和药物敏感性试验方面进行未来的创新。新方法可以影响工作流程，并极大改变我们对能力的要求。

有关如何选择自动化系统的更多信息可见参考文献[42]。

十四、未来展望

CML 自动化的程度及自动化程序的多样性将继续增加。持续发展将使系统变得更灵活，并导致更能适应每个实验室条件的产品出现。自动化技术正快速发展，不久将涉及附加检测，如血培养系统的直接检测和分子诊断技术。

微生物学实验室一直受困于变异性高且人工密集，而实验室自动化的主要目的是改进质量并保证流程的一致性。希望这些技术能使实验室人员集中在高技术需求的标本处理中。用于整合 POCT 设备的软件解决方案将进一步改善分析过程。

最后，数字成像处理作为细菌学临床诊断不可分割的一部分，将推动远程医疗的进一步发展。在许多中心实验室模式中，标本处理和平板判读可能不在同一地点进行。在这种情况下，通过与经验丰富的技术人员进行沟通，在小的实验室或遥远的区域依然可以保持质量标准。远程医疗可以帮助这些地区克服技术人才缺乏的状况。

进一步科学评价 TLA，还可以促进评估其临床相关性及对患者护理的影响。这可以减少错误，提高诊断微生物学的质量。与传统的微生物学方法相比，使用 Kiestra TLA 结合 MALDI-TOF MS 对血液培养分离物进行微生物鉴定的时间节省了 30.6 h[45]。有 12%(24/200)的患者因为早期的鉴定结果而改变了抗生素治疗方案。

十五、总结

由于微生物学技术方面的新进展及人员短缺，使得微生物学家重新思考实验室设计。也许传统的实验室模式在不远的将来会不复存在。TLA 在大容量实验室中可能会变成司空见惯的事情，最终将应用于较小的实验室。尽管实验室自动化很有前景，但它也有优点和缺点，可能并不适用于所有环境(表 6-3)。自动化不可能替代医学技术专家，但将通过 2 个重要的途径来改变需求：①数字成像将取代手工处理平板；②自动化的高效性将导致更多的实验室采用 24 h 培养-判读策略。由于技术不断进步，临床微生物学正在加速发展。实验室的设计需要更为灵活，以适应将来的发展。

参考文献请扫二维码查阅

第 7 章　分子微生物学

FREDERICK S. NOLTE

（李向阳　译；徐元宏、王辉　审校）

自从本手册第 11 版出版后，诊断分子微生物学发生了显著的变化。核酸扩增试验广泛应用在感染性疾病的诊断和患者的管理中。美国 FDA 核准/批准的检测试剂盒和专用分析试剂（analyte-specific reagents，ASRs）的数量增长促进了该项技术在临床实验室的应用。核酸扩增、自动化、测序和多重分析等技术上的进步，重新激活了该领域并创造了增长的新契机。"样品进去-结果出来"的简单的分子检测系统也已经出现，并应用于各种实验室及实验室以外的部门。最近增长最显著的领域之一是多参数或多基因复合探针的开发和应用，这些探针能够识别与多种疾病综合征相关的大多数常见病原体。

就测试数和临床相关性而言，分子微生物学在分子病理学领域仍处于领先地位。以核酸为基础的检测方法降低了临床微生物学实验室对更传统的以抗原检测和基于培养方法的依赖，创造了实验室参与患者诊疗的新机会。本章主要讨论核酸探针、信号及目标扩增技术、扩增后的测定及分析、这些技术的临床应用，以及这些技术给临床实验室带来的特别的挑战和机遇。第 11 章将介绍分子检测方法在流行病学调查中的应用，第 17 章将包括宏基因组学和新病原体发现等内容。

一、非扩增核酸探针

核酸探针是标记了放射性核素、酶或化学发光报告分子的能与互补的核酸序列高度特异性结合的 DNA 或 RNA 片段。尽管探针的长度可达 15 至几千个核苷酸，但用在各种商品化试剂盒中的人工合成的寡核苷酸片段通常<50 个核苷酸。探针可以设计成适用于各个分类水平的微生物的鉴定。大量商品化的 DNA 探针用于直接测定临床标本中的病原体，以及分离培养后病原体的鉴定。

最常用的探针杂交方式包括液相、固相及原位杂交。最早在临床微生物学实验室使用的是液相杂交保护分析（Hologic，San Diego，CA）。该方法将吖啶酯标记的单链 DNA 探针与目标核酸共同孵育，杂交后在碱性条件下将未结合的探针上的吖啶酯水解，与目标核酸结合的探针受到保护不被水解，加入过氧化物后发光，用光度计测量该结合的探针。该方法无须去除未结合的单链探针或分离与探针结合的双链片段，并能在数小时内完成检测[1]。

固相杂交技术是将目标核酸固定在尼龙膜或硝酸纤维膜上再与溶液中的探针杂交[2]。将未结合的探针洗脱出去后，测定荧光、发光、放射性或颜色等的变化确认结合的探针。尽管固相杂交是非常有用的研究工具，但所需时间长和操作程序复杂限制了其在临床实践的应用。

原位杂交技术是另一类型的固相杂交技术，将前面所述的同样基本原理应用于附着在载玻片上的组织和细胞内核酸的检测[3]。临床上常用于福尔马林固定和石蜡包埋的组织切片。原位杂交技术的敏感性常受限于细胞内目标核酸的可及性。

一般情况下，由于非扩增探针技术的敏感性较低，应用这些技术直接测定临床标本中的病原体仅限于有大量微生物存在的情况，包括 A 群链球菌咽峡炎和阴道病及阴道炎相关病原体的检测。这些技术应用在结核分枝杆菌和系统性双相真菌培养结果的确认试验中更有效。对于生长缓慢、通常难以鉴定的病原体，这些培养确认

试验提供了快速准确的检测，提升了患者管理的有效性。

Hologic核酸探针能直接测定A群链球菌，也能从分离培养物中鉴定皮炎芽生菌、粗球孢子菌、组织胞浆菌、产单核李斯特菌、分枝杆菌属、淋病奈瑟菌、金黄色葡萄球菌和肺炎链球菌。

来自BD诊断系统(Sparks, MD; Affirm Test)的固相核酸探针可以从细菌性阴道病或阴道炎患者的阴道分泌物中测定并鉴定阴道加德纳菌、阴道毛滴虫和念珠菌属的某些种。它针对每种微生物使用一个捕获探针和一个颜色标记探针，非常方便。

肽核酸(peptide nucleic acid，PNA)探针是DNA的类似物，由一个不带电荷的聚酰胺或"肽"骨架替换了DNA带负电荷的糖磷酸骨架。PNA探针包含与DNA同样的核苷酸碱基，它与其互补的序列杂交时遵照标准的沃森-克里克(Watson-Crick)的碱基配对规则[4]。由于PNA探针不带电荷，不需要克服2个带负电荷的DNA分子杂交时产生的令杂交不稳定的静电排斥力，因此，PNA探针与目标核酸结合更快、更紧密。此外，PNA探针相对的疏水性能使得它们可以透过标准制备的涂片上疏水性的细胞膜。

AdvanDxPNA(OpGen，Gaithersburg，MD)[5-7]针对rRNA序列的PNA荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization，FISH)探针能快速直接鉴定血培养阳性瓶中的金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、*mecA*基因、粪肠球菌、选定的肠球菌属其他种、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌及念珠菌的某些种。图7-1显示了荧光显微镜下大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌3种细菌混合物，用3种不同荧光染料标记的PNA原位杂交荧光探针检测后的结果。

Accelerate Diagnostics公司(Tucson，AZ)已开发出全自动化的FISH方法，并作为其Accelerate PhenoTest BC快速鉴定和抗菌药敏试验试剂盒的一部分，用于直接鉴定血培养阳性瓶中的病原体[8]。该技术能够实现样品制备和标记寡核苷酸与目标核糖体RNA的快速杂交，并可在同一系统中实现数字显微镜捕获信号和数据分析处理。它可在90 min内完成14种不同的细菌和2种念珠菌的鉴定工作。

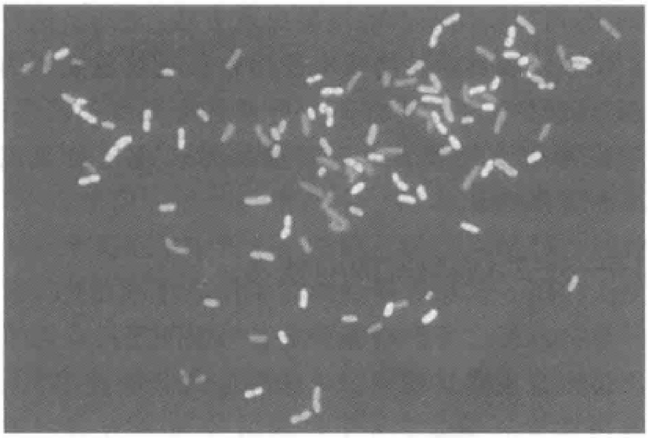


图7-1 PNA探针用于大肠埃希菌(绿色)、肺炎克雷伯菌(黄色)和铜绿假单胞菌(红色)检测(经OpGen许可，摘自http://www.opgen.com/pathogenid/image-gallery/)，见彩插

二、核酸扩增试验

Saiki等[9]建立的PCR技术是生物技术的里程碑，开启了分子诊断的新纪元。虽然PCR技术是最广泛应用的核酸扩增试验，而其他技术也在不断发展。后文将讨论在临床中应用的基于信号、目标或者探针扩增等技术，它们在实验医学中具有无可比拟的敏感性，为临床实验室参与患者的诊疗创造了新的机会，并成为许多感染性疾病实验室诊断的新的金标准。

三、信号扩增技术

在信号扩增技术中，探针和目标的浓度不增加，分析敏感性的增加源于针对目标核酸的标记分子的浓度增加。多重酶、多重探针、多层探针和降低背景噪音等都可用来增强目标的测定[10]。信号扩增技术的分析敏感性通常低于目标扩增技术，随着技术的进步，特别是分支-DNA(branched-DNA，bDNA)技术，其检测下限能达到某些早期目标扩增技术相近的检测水平[11]。

信号扩增技术比目标扩增技术具有多个优势。在信号扩增技术中，目标序列的数量不变，结果直接与临床标本中的目标序列数量相关，这减少了交叉污染导致的假阳性结果，简化了定量分析过程；信号扩增系统不依赖于酶促过程扩增目

标序列，因此，它不受临床标本中存在的酶抑制剂影响，可以使用简单的核酸提取方法；尤其是信号扩增技术较目标扩增技术使用较长或数量更多的探针，减少了因目标序列的异质性而导致的错误；它也可以直接测定 RNA 量而无须通过转录成 cDNA 再测定。

（一）分支-DNA（bDNA）技术

bDNA 信号扩增系统是一个固相的、包含了多位点合成寡核苷酸探针的夹心式杂交技术[12]。这项技术的关键是分子扩增，1 个 bDNA 分子有 15 个相同的分支，每个能结合 3 个标记探针。

bDNA 信号扩增技术的说明见图 7-2。多个目标特异性捕获探针将目标核酸捕获在微孔板表面，随后第二个目标特异性探针与之结合，预扩增分子结合到第二探针上形成 8 个 bDNA 扩大器，3 个碱性磷酸酶分子标记的探针与扩大器的每个分支结合。结合的标记探针与酶触发底物-二氧杂环丁烷混合孵育后，用发光光度计检测光的强度，测得的光强度与样品中目标核酸的数量成正比。根据外部标准曲线确定样品中目标核酸的数量。

任何扩增探针和非目标核酸的非特异性杂交，将使背景信号扩增。在第三代 bDNA 分析系统中，为了降低潜在的非目标核酸的杂交，将异胞苷（isoC）和异鸟嘌呤核苷（isoG）整合入预扩增分子和标记探针[13]。isoC 和 isoG 互成碱基对，而不与天然的 4 种碱基中的任何一种结合[14]。用包含了 isoC 和 isoG 探针的 bDNA 分析系统增加了目标特异性信号的扩增而没有伴随背景信号增强，因而极大提高了检测下限而不损失特异性。第三代 bDNA 分析系统测定 HIV RNA 的检测限为 75 拷贝/ml。商品化的定量检测 HBV-DNA、HCV-RNA 和 HIV-RNA 的 bDNA 分析系统也已面世（Siemens Healthcare Diagnostics，Deerfield，IL）。SiemensVersant 440 型 bDNA 分析系统能自动完成孵育、洗涤、结果读取及数据分析等过程。虽然这些检测系统已不再市售，但该项技术在病毒载量检测的发展中发挥了重要作用。

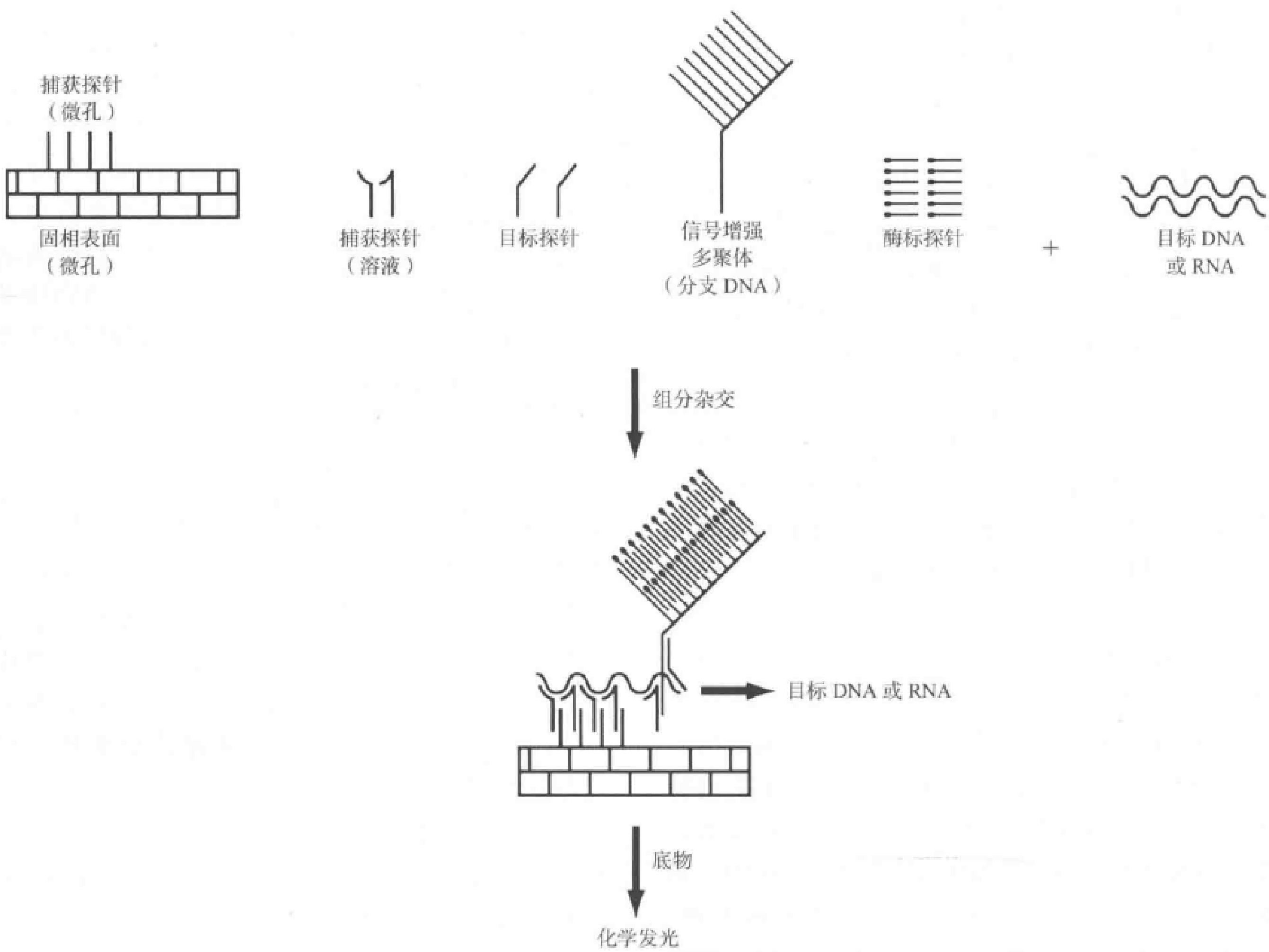


图 7-2 bDNA 信号扩增技术（获 Elsevier 授权许可从参考文献[230]重印）

(二)杂交捕获技术

杂交捕获技术是液相杂交抗体捕获的方法，杂交分子用化学发光测定(图7-3)。标本中的目标DNA变性后与特异性的RNA探针杂交形成DNA-RNA杂交体，被包裹在管壁上的抗杂交体抗体捕获。碱性磷酸酶标记的抗杂交体抗体与被捕获的杂交体结合。结合后的抗体复合体采用化学发光底物、发光光度计测量光度值进行检测。多个碱性磷酸酶结合物结合到每个杂交分子，扩大了信号。所发出的光的强度与标本中的目标DNA的量成正比。Qiagen(Germantown，MD)的杂交捕获技术用于测定临床标本中的高危型人乳头瘤病毒(human papillomavirus，HPV)[15]。这些分析系统都有手动和自动的仪器。

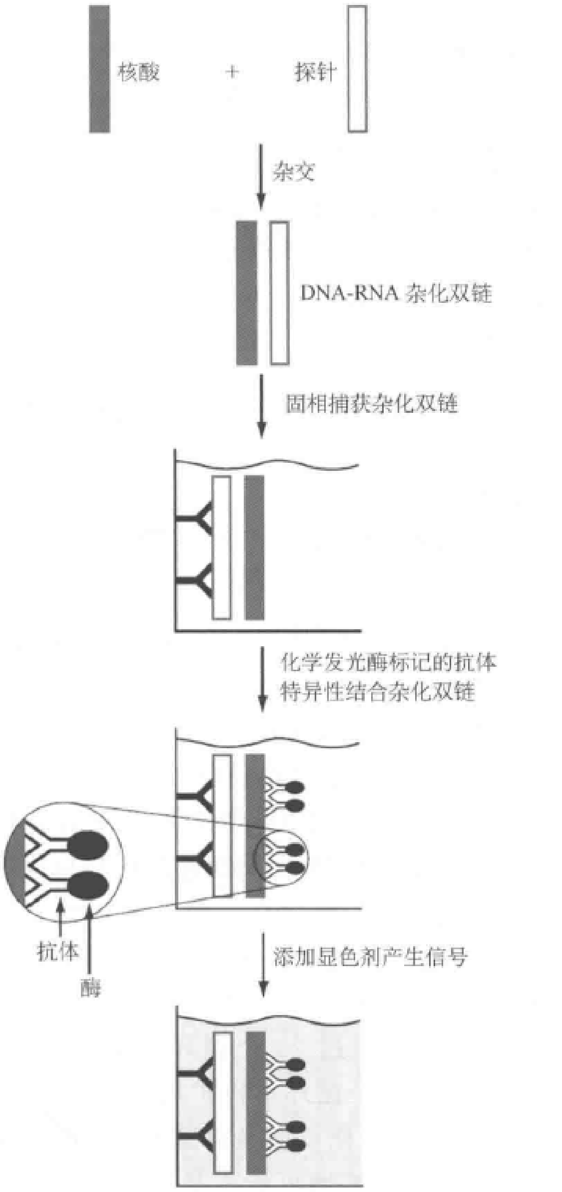


图7-3 杂交捕获信号扩增(获Elsevier授权，从参考文献[230]重印)，见彩插

(三)酶切侵入技术

Invader系统(Hologic)是依靠来自于FEM-1家族的DNA多聚酶，特异性识别并裂解特定的DNA结构的信号扩增技术。这个多聚酶切除碱基配对的双链中其中一条链上的5′单链瓣。这种酶的活性可能在消除核酸复制和修复过程中产生的复杂核酸结构起着重要的作用。由于这些结构可能发生在一个基因组复制中的任何地方，因此，这个酶只识别底物的分子结构，而不考虑组成DNA复合体的核酸序列[16-17]。

在Invader系统中，设计了2条与目标序列重叠杂交的探针(图7-4)。在适当的退火条件下，寡核苷酸探针与目标序列结合。侵入寡核苷酸探针设计成在侵入3′末端和探针的5′末端间，且与上游的杂交序列重叠的区域。裂解酶将探针的5′端切割下来。在这个过程中目标序列作为一种支架，形成正确的DNA结构。由于作为裂解酶底物的DNA结构只发生在有目标序列存在的情况，因此，裂解产物的生成表示目标序列的存在。使用热稳定的裂解酶能使反应在足够保持引物间交换存在平衡的高温运行。这个方法可以使用多种裂解酶形成一个单一的目标分子。荧光共振能量转移(fluorescent resonance energy transfer，FRET)探针和二次侵入裂解反应用于检测目标特异性产物。FDA批准了Hologic试剂用于检测子宫颈样品中HPV高风险基因型群——16和18基因型[18-19]。

四、目标扩增技术

所有的目标扩增技术都具有使用酶介导过程的特点，用一个或多个酶来合成目标核酸的拷贝。在这些系统中，扩增产物由2条结合到目标双链的相对链上的互补序列的寡核苷酸引物所测定。均能在数个小时内产生百万至亿万的目标序列的拷贝，在每一个反应中，扩增的产物能作为下一轮扩增的模板。该技术对产物分子的污染极其敏感，导致假阳性结果发生，应在临床实验室使用前充分解决。潜在的交叉污染是真实存在的，可以通过特殊的实验室设计、操作和工作流程来减少假阳性反应的发生。

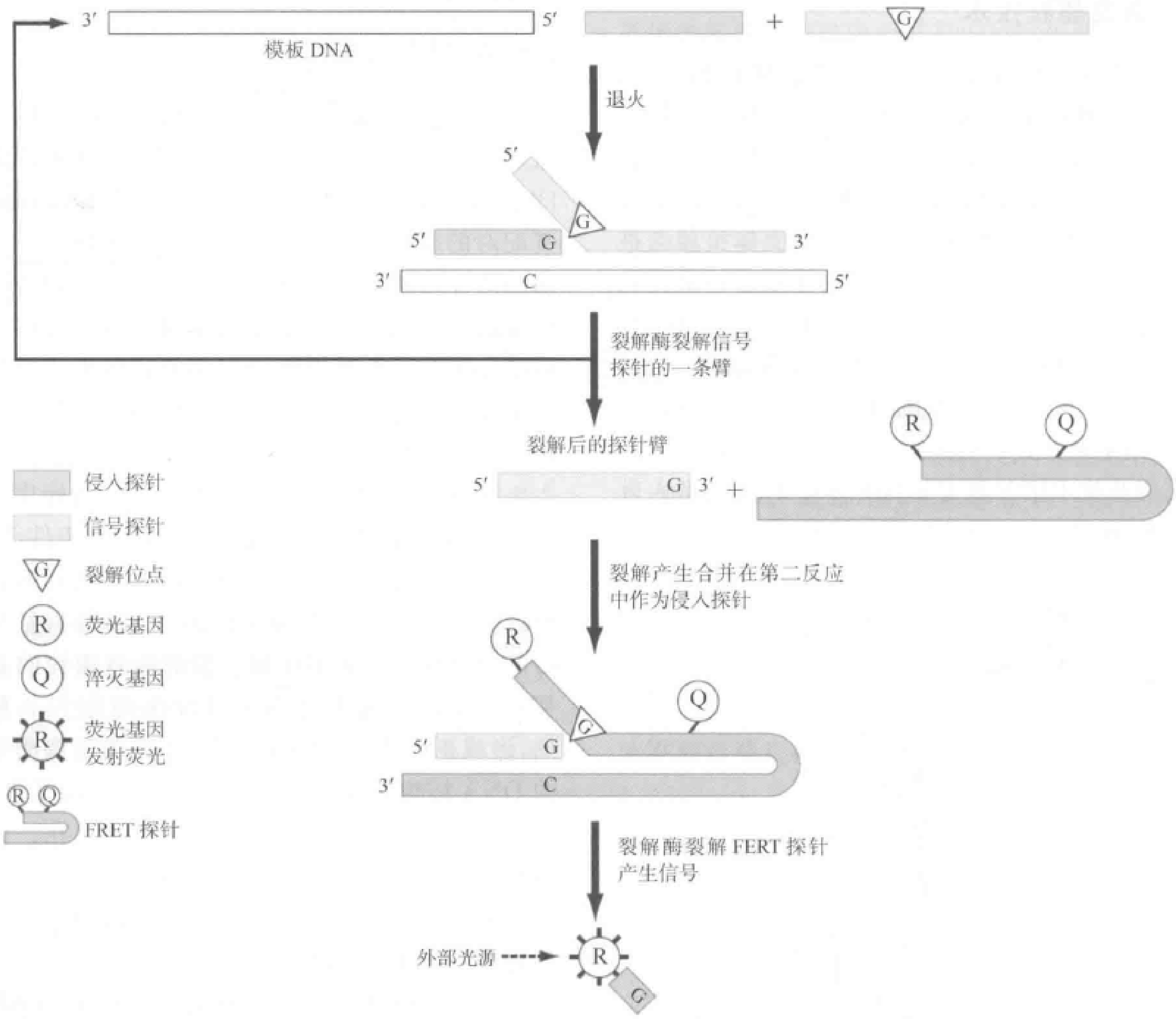


图 7-4 裂解酶-侵入探针为基础的扩增(获 Elsevier 授权许可从参考文献[230]重印),见彩插

(一)聚合酶链反应

聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)是一种简单的体外化学反应,允许合成几乎无限数量的目标核酸序列。这是通过 DNA 多聚酶的作用,在适当的条件下复制一个 DNA 链来完成的(图 7-5)。最简单的 PCR 是由目标 DNA、两个超过 1 mol 的引物、热稳定的 DNA 多聚酶、等摩尔的脱氧核糖核苷三磷酸混合物(dNTPs:dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP)、氯化镁、氯化钾和 Tris-HCl 缓冲液所组成。2 个引物位于待扩增的双链 DNA(dsDNA)序列两侧,待扩增 dsDNA 通常<100 到几百个碱基。引物与目标序列相对链互补。

为启动 PCR,需将反应混合物加热使目标 DNA 的双链分离为 2 条单链,然后冷却,使引物以序列特异性的方式退火到目标 DNA。DNA 多聚酶在引物 3′端开始向下延伸。引物延伸产物通过加热与目标 DNA 分离。每次延伸的产物及原来的目标核酸可作为随后引物退火和延伸的模板。

在每个周期结束时,理论上的 PCR 产物数量翻了一番,在 n 个 PCR 周期循环后目标序列可以增加 2^n 倍。整个程序在一个可编程的和精确控制温度的热循环仪中完成,可以控制扩增的步骤、反应混合物在不同温度下持续的时间长短和循环次数。理论上经过 20 个循环的 PCR 可以达到 10^6 倍扩增,30 个循环可以扩增 10^9 倍。实际上,由于未能充分优化反应条件或存在 DNA 聚合酶抑制剂等情况,扩增可能不是完全有效的。在这种情况下,总的扩增结果最好的描述是 $(1+e)^n$,其中 e 是扩增效率($0 \leqslant e \leqslant 1$),n 为总循环数。

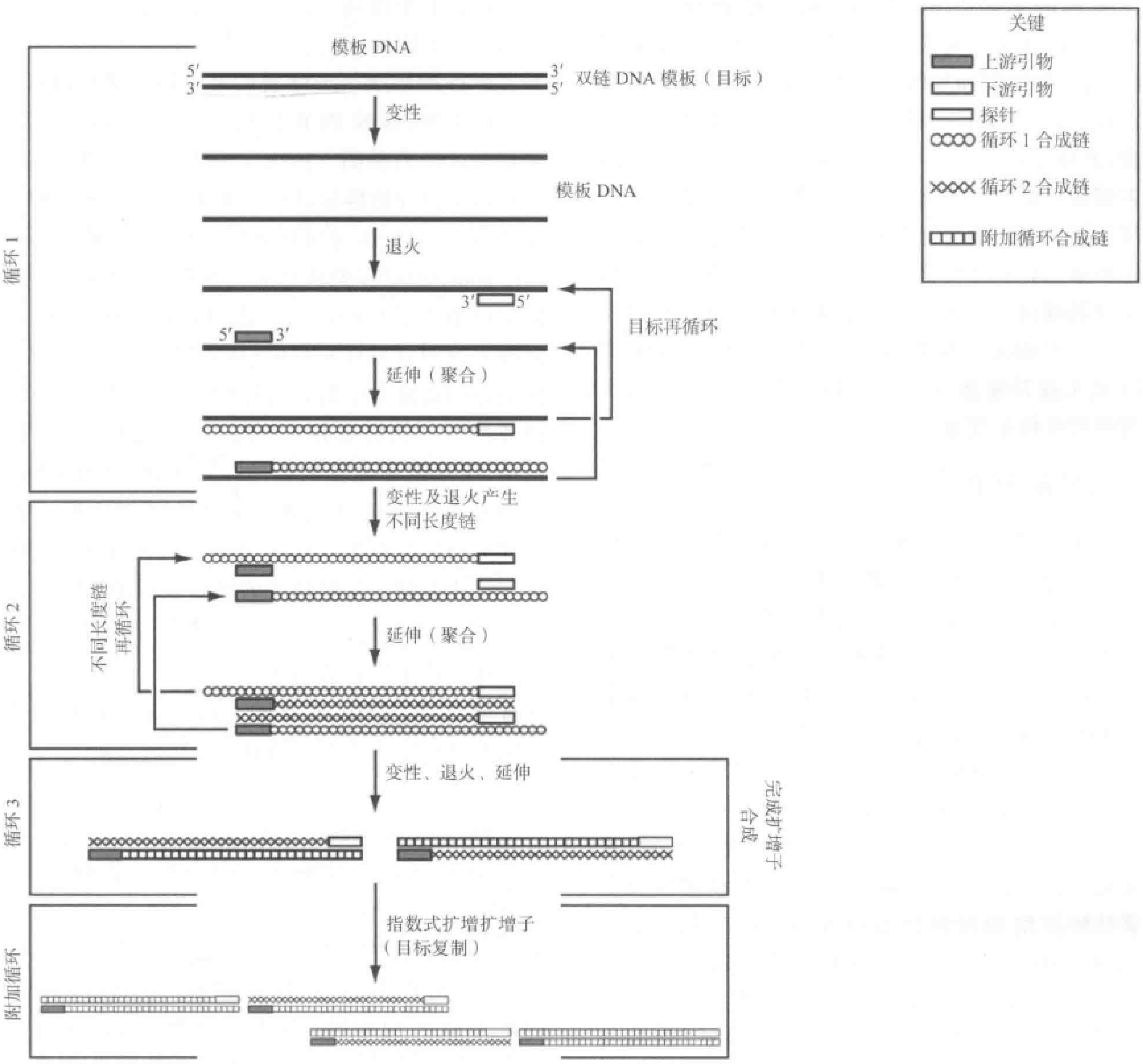


图 7-5 PCR 目标扩增(获 Elsevier 授权许可从参考文献[230]重印)，见彩插

(二)逆转录酶 PCR

正如前所述的那样，PCR 是一种 DNA 扩增技术。扩增 RNA 目标需要逆转录酶 PCR(reverse transcriptase PCR，RT-PCR)，在这个过程中，首先从目标 RNA 中逆转录出 cDNA，然后通过 PCR 扩增该 cDNA。最初的 RT-PCR 应用两种酶，一种热不稳定的逆转录酶(reverse transcriptase，RT)如禽痘病毒 RT 和另一种热稳定 DNA 多聚酶。由于热不稳定酶对温度有要求，因此，cDNA 的合成温度低于引物最佳的退火温度。由于 RNA 形成了二级结构，此过程中存在非特异性引物退火和无效的引物延伸的问题。从嗜热链球菌(*Thermus thermophilus*)开发的耐热 DNA 多聚酶，很大程度上解决了上述问题。这类酶在适当的条件下，可以有效地发挥逆转录和 DNA 多聚酶的作用[20]。使用这些酶的 RT-PCR 较以往用传统的热不稳定 RT 酶的方法更具特异性和效率。

(三)巢式 PCR

巢式 PCR 比 PCR 更具敏感性和特异性。它使用两对扩增引物和两轮 PCR。其中一对引物用于第一轮的 15～30 个循环的 PCR，其产物作为第

二轮 PCR 引物扩增的模板。第二轮 PCR 引物的扩增范围在第一对引物的范围内。由于具备更高的总循环数，其敏感性得到提高，其特异性通过第二对引物仅对第一轮的产物进行扩增而得到提高，并且验证了第一轮产物的特征。巢式 PCR 的主要缺点是高污染率，主要发生在第一轮产物转移至第二轮扩增管过程中。这种污染可以将第一轮和第二轮扩增的试剂加盖一层石蜡或油进行物理分隔或设计成单管包含全部扩增的过程而得以避免。实际上，临床诊断应用中很少通过巢式 PCR 来提升敏感性。巢式 PCR 的扩增产物通常用核酸探针杂交来确认。

(四)多重 PCR

在多重 PCR 中，将 2 对或多对针对不同目标的引物用于同一个反应混合体系[21]。可对临床标本中的多个目标序列在一根管子里进行扩增。多重 PCR 的引物必须仔细选择，使它们具有类似的退火温度和不具有互补性。多重 PCR 与单对引物 PCR 相比更为复杂，而敏感性可能较低。

已开发了多种多重 PCR 系统，用于中枢神经系统[22-23]、呼吸道[24-27]、血流[28-30]和胃肠道[31-32]感染的检测。根据单个扩增产物检测方法不同，其应用规模可以从几个到 20 个或更多的靶标。多重核酸扩增和检测技术的发展，使以器官-系统(organ system-based approach)为基础的分子微生物学可以媲美或超越培养方法所能提供的综合诊断结果。xMAP 系统(Luminex Corp.，Austin，TX)是第一个高通量的多重 PCR 分析平台。xMAP 系统采用了专利的含有 2 种不同的荧光光谱染料的聚苯乙烯微球。将荧光染料按不同比例组成 100 个具有特定光谱特征的不同的微球集阵列。通过碳二亚胺耦合将不同的寡核苷酸探针共价结合在每个微球集的表面用于核酸分析。由于每个微球集具有其光谱特征，因而可将不同的微球集组合在单一的反应管中，同时测定多达 100 个不同的分析物。3 种荧光染料能报告发生在微球表面的相互作用的生物分子数量。

在 Luminex xMAP 流式细胞仪中，快速流动的鞘液带动微球，当微球通过 2 个单独的激光器时，可逐一被检测出来。高速数字信号处理器基于每个微球的光谱特征对其进行分类，并定量测定其表面的反应。在一个单一的反应管内，每秒钟测定数千个微球，几秒钟内能够分析和报告多达 100 个不同的反应。

运行在 Luminex 平台的多重检测通常包括 3 个主要步骤：核酸 PCR 扩增、特定目标的延伸及液相微球阵列解码。PCR 扩增后，扩增产物与第二套各个目标的特异性引物相混合。如有目标存在，则目标引物通过目标特异延伸(target-specific extension)的过程延伸开来。在延伸过程中，一个标记也纳入了延伸产物。此时，加入颜色编码的微球去识别检测目标和标记的延伸产物。每个不同颜色的微球上依附着与目标标记序列互补的寡核苷酸。样品放置在 Luminex xMAP 流式细胞仪中，用双色激光读取微球。一个激光识别微球的颜色，另一个激光检测微球上有无存在标记的延伸产物。最近 Luminex 介绍了一种将分析时间从 8 h 减少到 5 h 和较少的操作步骤的更精简的流程，但这个“快速”流程可能会降低敏感性[33]。

这项技术广泛适用于细菌学[34]、真菌学[35]和病毒学[36-37]。FDA 批准了 Luminex xMAP 系统应用于呼吸道病毒和胃肠道病原体的检测[33,38]。

另一颇具前景的高通量多重 PCR 是由 BioFire Diagnostics(Salt Lake City，UT)[26]建立的 FilmArray 系统。这是一个完全自动化的、集成的、独立的一袋式实验系统(lab-in-a-pouch)。袋的膜部有细胞裂解站、核酸纯化、逆转录检测目标 RNA、首轮 PCR、多重 PCR 和第二轮高达 120 个的巢式 PCR 的阵列。从未经处理的样品中提取和纯化核酸后，FilmArray 进行两轮的巢式多重 PCR。首轮的 PCR 过程是单一的、大容量和大规模的多重反应，其 PCR 的产物经新的无引物扩增缓冲液稀释混合后，再平均分配到反应阵列板的每个孔中。每个孔均有预置的单独一套引物。第二轮是在阵列的每个孔中进行单个小体积的 PCR。此阶段的反应结束后，采用熔解曲线分析确定每个目标。虽然这种检测方法使用巢式 PCR，但整个测试在一个密封袋中完成，因而消除了携带污染的问题。FilmArray 软件根据扩增和熔解曲线数据自动得出目标测定结果。全程仅需 2～3 min 的手动操作及 1 h 的分析时间。FDA 已批准 FilmArray 板用于呼吸道病原体、胃肠道和中枢神经系统病原体的直接检测，以及阳性血培养物的菌株鉴定[39-41]。

(五)实时(同时、动态的)PCR

"实时 PCR(real-time PCR)"一词描述的是目标扩增和检测在同一管中同时(homogeneous)进行。这些方法需要装备有精密的光学系统的特殊热循环仪,监测样品孔荧光发射强度变化。这些仪器的计算机软件可以监测每个 PCR 循环并生成每个反应的扩增图(kinetic,动态的)。

图 7-6 显示一个有代表性的扩增图,并定义了定量实时 PCR 的术语。扩增图显示了每个循环数中报告的标准化的荧光信号。在 PCR 的初始周期中,荧光信号变化不大,这个初始信号的水平定义为基线。基线水平之上增加的荧光信号表明检测到的累积扩增产物数量。在基线之上可以设置一个固定的荧光阈值。循环阈值(cycle threshold,C_T)是指荧光量超过固定阈值时的周期数。在一个标准的情况下,初始目标浓度的对数值与 C_T 数是一条直线图[42]。通过测量样品的 C_T 值和标准曲线来计算样品中的起始拷贝数,作为未知样品中的目标数量。另外,荧光变化最大或者次代拷贝数最多的循环数,与初始目标浓度也有着类似的相关性。

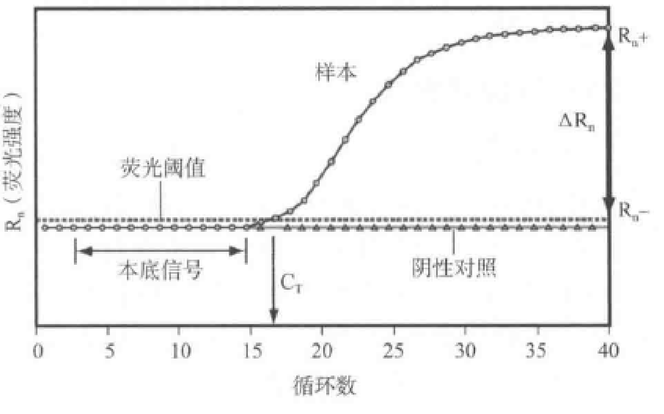


图 7-6 实时 PCR 扩增图及常用的术语和缩略词

注:R_n. 来自报告染料的标准荧光信号[来自 TaqMan Universal PCR Master Mix Protocol,Applied Biosystems,Foster City,CA,2002),授权重印],见彩插

利用与双链 DNA 有亲和力的荧光染料是检测 PCR 产物最简单的方法。已用于 PCR 产物检测的 SYBR green Ⅰ 就是这类荧光染料[43]。此染料在游离状态时荧光值相对较低,当与双链 DNA 结合后荧光值大大增强(图 7-7a)。它可以与特异的和非特异的 PCR 产物结合。通过熔解曲线分析,可以提高检测的特异性,随着温度的缓慢上升,扩增产物的双链 DNA 逐渐分离并伴随着荧光量减小。数据转换和分析是通过绘制第一次扩增产物的 Y 轴的荧光与 X 轴上的温度变化图完成的。特异的扩增产物在其所预测的熔解温度(T_m)中具有一个特征性的熔解峰,而引物二聚体和其他非特异性产物则有不同的 T_ms 或出现其他的峰[44]。

实时 PCR 的特异性也可以通过在反应缓冲液中使用 FRET 探针得以提高。这些探针标记荧光染料或将荧光染料和淬灭染料组合标记。在 5′ 核酸外切酶 PCR(TaqMan)检测中,Taq DNA 多聚酶具有从 5′ 至 3′ 外切酶的活性,用来切割在 PCR 引物延伸阶段的一个非延伸杂交探针[45]。该方法利用双荧光标记探针的方法(图 7-7b),一种荧光染料作为报告染料,其发射光谱为另一个荧光染料所淬灭。随着核酸酶降解杂交探针,释放出作为报告染料的荧光染料,其发射的荧光峰值随之增加。荧光强度的增加表明已经形成特异的 PCR 产物,其荧光强度与产物的数量相关[46]。试验中只有当引物和探针同时结合到相同的模板链时才产生信号,因此,其特异性增加。

双杂交探针是另一种实时 PCR 方法[47]。此方法使用 2 个特殊设计的序列特异性寡核苷酸探针(图 7-7c)。这些杂交探针设计成与 PCR 产物分子的 1～5 个核苷酸部分杂交。固定探针的 3′ 端标记供体染料,在报告探针的 5′端标记受体染料。报告探针的 3′端磷酸化,以防止其在 PCR 过程中延伸。外部光源激发不发光的供体染料,通过 FRET 将其能量转移到受体染料上,激活受体染料发出波长比游离供体染料长的光,发光强度与 PCR 产物的量成正比。

实时检测和定量分析扩增产物还可以用分子信标(molecular beacons)方法完成[48]。分子信标发夹状的寡核苷酸探针内部有淬灭的荧光基团,当探针与目标核酸结合时,荧光恢复(图 7-7d)。每个探针分子的环状部分序列与目标序列互补。探针末端的 2 个臂通过退火将互补序列结合起来形成探针的茎。一个臂的末端附有一个荧光染料,另一个臂的末端附着一个淬灭分子。荧光基团和淬灭分子在探针的茎部紧密接近而不产生荧光。当探针遭遇目标分子时,可形成一种比茎更长和更稳定的杂交体,迫使茎环双臂分开发生构

象改变，荧光基团和淬灭分子相互远离而恢复荧光。

蝎探针(scorpion probes)结合了 PCR 引物和分子信标技术[49-50]。环状结构的分子内杂交体随着扩增产物下游部分的延伸将荧光报告基团和淬灭基团分开。蝎探针的引物和探针位于同一分子上，其杂交速率快于一般分子信标方法(图 7-7E)。

黑暗淬灭探针(dark quencher probe)也常用于实时定量 PCR(ELITech Group，Princeton，NJ)。黑暗淬灭探针包含 5′末端荧光基团和 3′末端无荧光的淬灭分子[51]。当探针随意盘绕时荧光淬灭，一旦探针退火与目标序列结合则发出荧光(图 7-7f)。与荧光 5′核酸酶探针不同，在目标序列扩增时 DNA 多聚酶不降解这些探针。黑暗淬灭分子无荧光，不产生背景信号，因此，提高了检测系统的信噪比和敏感性。这些探针包含一个称为小沟结合剂(minor groove binder，MGB)的杂交稳定复合物。MGB 是一个小的新月形分子，跨越 3～4 个核苷酸与探针的 3′末端共价连接紧贴在 DNA 的小沟中，形成氢键与模板结合。MGB 提高了探针的 T_m。MGB 通常用于较短的探针以增加探针的 T_ms，它还可以维持高的 T_m 的水平，从而增加了检测的特异性。

另一种用于检测、鉴定和定量实时 PCR 扩增产物的方法，是使用非标准的 DNA 碱基对 isoG 和 isoC[52-54]。这些合成的碱基互相配对，但不与天然的鸟嘌呤和胞嘧啶结合，且可以共价连接到各种各样的报告基团上。在 MultiCode-RTx assays(Luminex Corp.)系统中，扩增使用的正向引物带有单一 isoC 的核苷酸，其 5′末端标记荧光，反向引物为未标记的标准碱基组成。在扩增过程中加入了 isoG 与荧光淬灭分子联结的复合物，每个 PCR 循环中 DNA 多聚酶在特异位点将其掺入而使荧光淬灭分子与荧光基团非常接近，导致荧光强度降低。荧光变化的周期数与标本中的目标分子的初始数量相关。许多标准类型的实时 PCR 仪器都能很容易地监测荧光量的减少。扩增反应后熔解曲线分析可以鉴定扩增产物并检测其序列变异。Luminex 的 MultiCode-RTx ASRs 系统能检测或定量检测各种细菌、病毒、真菌和原虫。

一类新的、非对称的、部分双链的线性探针也可用于实时 PCR 分析[55]，其设计和原理如图 7-7g 所示。部分双链探针是由 2 条长度差异很大的互补的寡核苷酸组成。长链是目标特异性链，在 5′端标记荧光素而将 3′末端封闭阻止延伸。短链与长链的 5′端互补，在其 3′端结合着荧光淬灭染料。在目标序列缺失的情况下，带有淬灭染料的寡核苷酸与目标特异性寡核苷酸杂交，由于报告荧光基团和淬灭染料基团非常接近导致不发荧光。当目标序列存在时，长链优先结合到目标序列，使报告荧光基团和淬灭染料基团分离从而增加荧光。部分双链探针由于增加了的探针长度和严格的杂交条件，比分子信标和 TaqMan 探针可以更好地用于那些具有高水平遗传异质性的靶标如 HIV-1 检测[56]。部分双链探针已在 Abbott(Abbott Park，IL)仪器上用于 HIV-1 和 HCV 病毒载量的检测。

RT-PCR 省略了常规 PCR 扩增后的处理步骤，减少了核酸检测所需的时间；由于扩增和检测在同一个封闭的管中进行，消除了扩增后操作导致扩增产物实验室污染的可能；RT-PCR 早在产物对数增长期进行定量测定，减少了样品间扩增效率不同所带来的结果误差，保证了良好的定量结果。然而，这些方法所用的荧光吸收和发射的光谱重叠，使得多重分析的容量受限，只能测试 4～5 种目标[57]。

(六)熔解曲线分析

实时 PCR 的连续监测表明通过染料和大多数探针，可以跟踪温度循环中的杂交过程，但水解探针在信号产生过程中被破坏而无法进行。通常在 PCR 之后进行单个熔解曲线分析可代替整个 PCR 过程的杂交监测(图 7-8)。曲线的中点称为解链温度(T_m)，主要由 GC 含量和双链区的大小决定。实现 DNA 熔解曲线分析有赖于实时 PCR 仪中的荧光检测计和温控装置[58]。

用染料标记产物有助于通过 T_m 和曲线形状确认扩增产物的同一性。T_m 和曲线形状都可以被预设[59]。>200 bp 的 PCR 产物通常具有多个熔解区，异质性产物产生异源双链，两者都会影响曲线形状。高分辨率熔解曲线分析使用 T_m 和曲线形状的细微差异进行基因分型和突变扫描[60]。虽然高分辨率熔解曲线分析通常是作为一种研究性的工具，但 FDA 已核准 BioFire 公司生产的综合检测板。

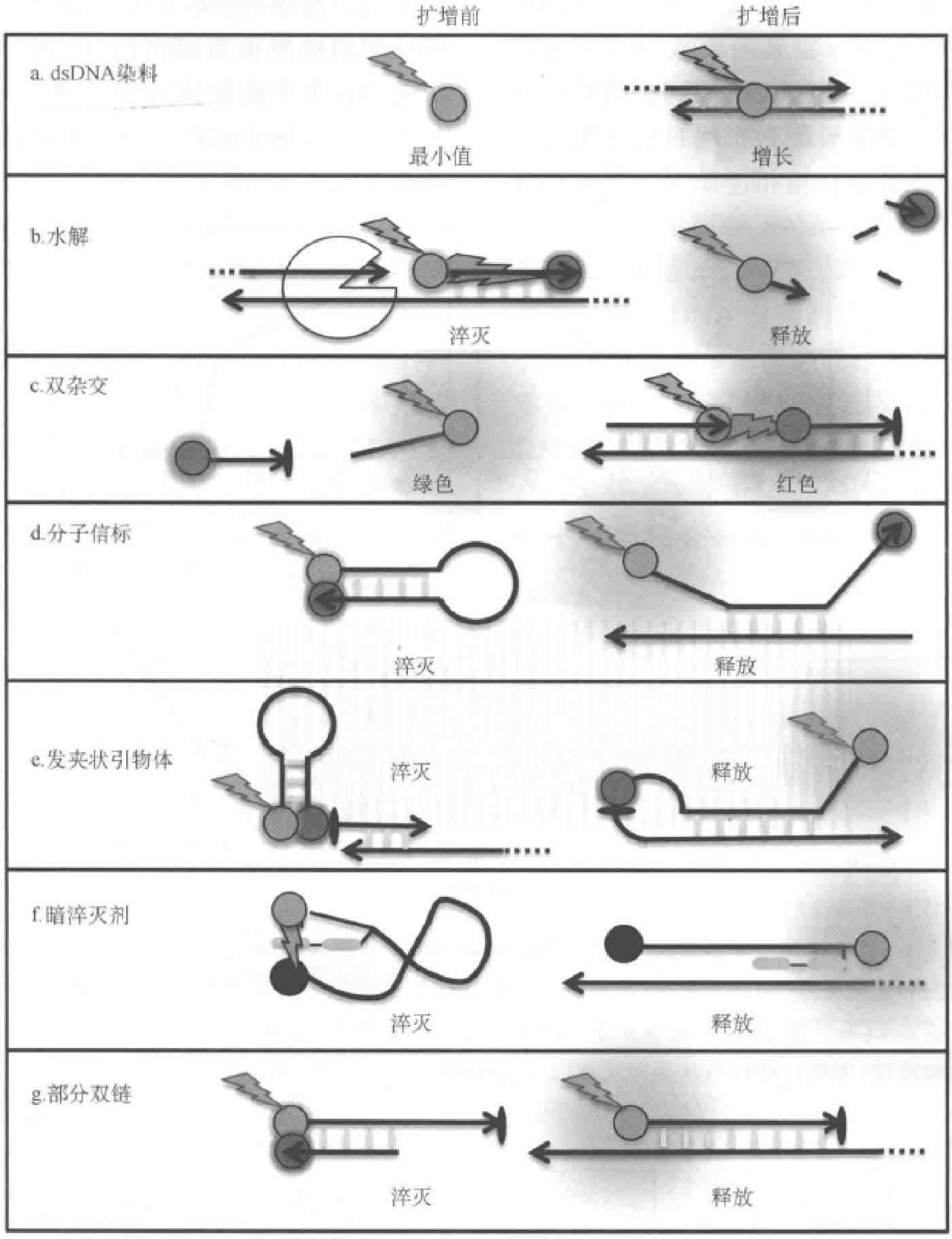


图 7-7 用于实时 PCR 的常用探针和染料。绿色"闪电"样图形表示激发光；绿色小圆表示荧光基团，暗红色小圆表示淬灭剂，黑色小圆表示暗淬灭剂；开口灰色大圆代表一种具有 5′-3′外切酶活性的聚合酶；黑色薄椭圆表示阻隔剂，橙色"香肠"样图形表示次要/小沟槽结合物

注：a. 双链 DNA 染料与 DNA 结合时，荧光值显著增加；b. 水解探针在荧光报告分子和淬灭剂之间被切割，导致荧光增强；c. 双杂交探针在杂交时通过共振能量转移改变颜色；d. 分子信标发夹淬灭荧光，直到目标结合将淬灭剂与荧光团分开；e. 发夹状引物在天然构象中处于淬灭状态，但当引物发夹环与其延伸产物杂交时荧光增强；f. 暗淬灭剂探针原始状态下被小沟槽结合物和暗淬灭剂淬灭，后与 DNA 杂交释放荧光；g. 部分双链探针的短链在模板 DNA 链的存在下被置换，由淬灭转为释放荧光(经许可从参考文献[58]重印)，见彩插

(七)数字 PCR

PCR 根据核酸的对数扩增、扩增循环数和扩增产物量来计算目标核酸的起始量。许多因素影响计算，特别是当目标核酸起始浓度低时，往往造成结果的不确定和不准确。数字 PCR(digital PCR)试图克服这些困难，将传统 PCR 的对数数据转换成简单地指示扩增是否进行的数字信号[61-64]。数字 PCR 的另一个优点是，它无须标准曲线即可提供目标核酸的绝对定量值。

数字 PCR 包括在大量的反应室(也称为分区)中进行实时的 PCR 或终点数据的采集(图 7-

9)。通过将模板稀释以创建数百乃至数百万的反应模板分区，其中至少存在某些模板分区不包含感兴趣目标序列拷贝。通过对检测到扩增目标序列的分区数(阳性)和未检测到扩增目标序列的分区数(阴性)进行计数以获得相应结果。每个分区的平均目标序列数的量化是通过对阳性分区的比例应用泊松校正来实现的，以补偿在某些分区中可能存在多个模板拷贝的情况。目前，数字PCR仪器可实现基于芯片或油包水乳液或液滴的分割或分区。

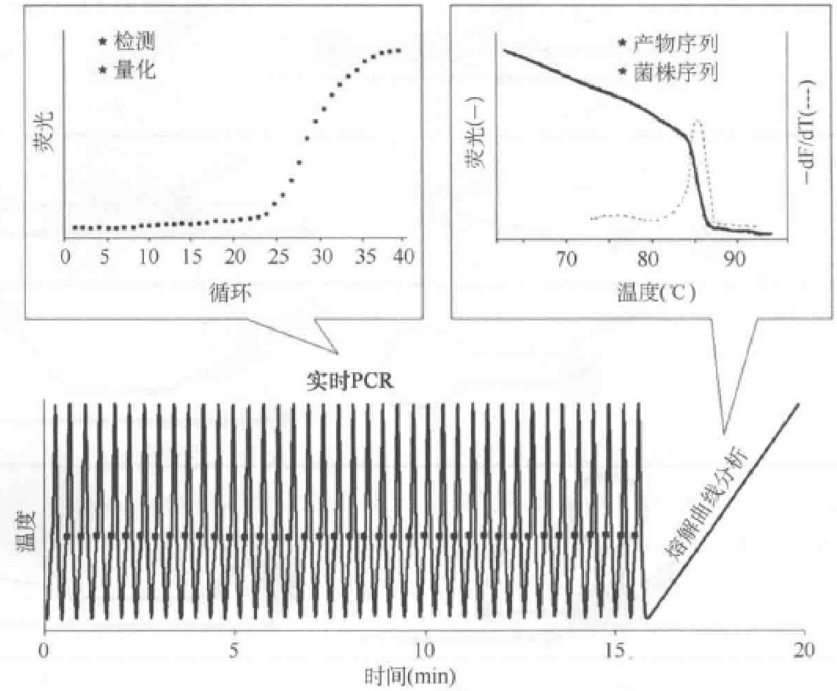


图 7-8 具有熔解分析的实时 PCR。通过在每个循环的延伸结束时监测一次荧光来实现检测和量化处理(实心方块)。扩增后立即进行熔解曲线采集。熔解曲线分析通过熔解温度鉴定 PCR 产物、微生物菌株和序列改变。原始熔解曲线数据(实线)也可以绘制为导数熔解曲线(虚线)(经许可从参考文献[231]重印)

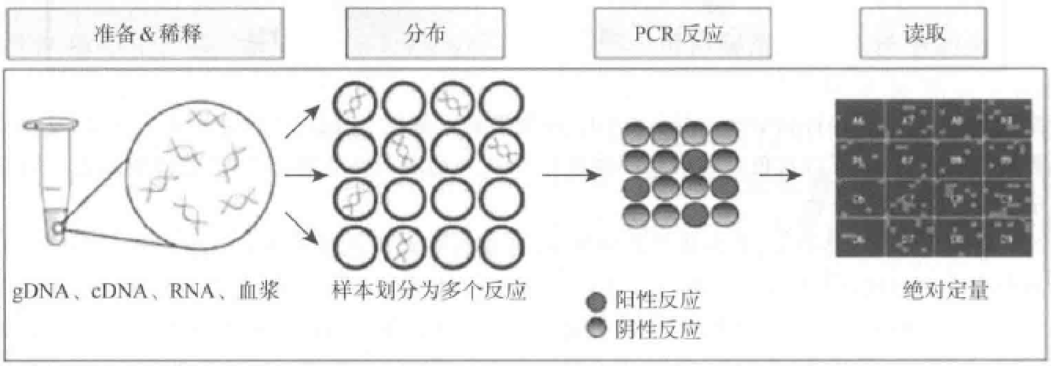


图 7-9 数字 PCR 是通过将样本分成许多纳升规模的单个 PCR 反应而进行，其中部分含有目标分子(红色)，部分则没有(灰色)。在 PCR 后，用阳性和阴性反应的比例来计算目标分子的起始数(从 Applied Biosystems QuantStudioOpenArrayDigital PCR Application Note 获得许可重印)，见彩插

数字 PCR 在微生物学中的主要应用是参考物质的绝对定量[65]、罕见遗传变异(如耐药变异[66])定量和病毒载量检测[67-68]。数字 PCR 的克隆扩增是本章后面要描述的众多“二代”测序方法的关键要素之一。

因成本相对较高、通量较低，数字 PCR 短时间内尚无法取代实时定量 PCR，但数字 PCR 技术有可能减小检测实验室的室内与室间差异，并能

提高测量极低拷贝数样品的精度，因此可以作为一种补充检测方法[69]。目前，可应用的数字 PCR 技术包括 RainDanceTechnologies（Billerica，MA）、Bio-RadLaboratories（Hercules，CA）、Life-Technologies（Carlsbad，CA）和 FluidigmCorporation（South San Francisco，CA）等。

（八）逆转录扩增技术

基于核酸序列的扩增（nucleic acid sequence-based amplification，NASBA）和转录介导扩增（transcription-mediated amplification，TMA）都是仿照逆转录病毒复制后的等温 RNA 扩增方法[70-72]。这个方法类似于目标 RNA 反向转录成 cDNA，然后 RNA 多聚酶合成 RNA 的复制品。NASBA 使用禽痘病毒逆转录酶、核糖核酸酶 H、T_7 噬菌体 RNA 多聚酶，而 TMA 使用具有内源性 RNase H 活性的 RT 酶和 T_7 RNA 多聚酶。

由含有 T_7 RNA 多聚酶启动子序列的引物从目标 RNA 合成与扩增有关的 cDNA（图 7-10）；随后，RNase H 降解 RNA-cDNA 杂交体中的初始目标 RNA 链；然后，第二对引物结合到 cDNA，并通过 RT 的 DNA 多聚酶活性的延伸，从而形成了含有 T_7 RNA 多聚酶启动子的双链 DNA。RNA 多聚酶产生了多拷贝的反义 RNA 单链。这些 RNA 产物分子再进入循环，随后产生更多的双链 cDNA 分子作为 RNA 合成的模板。该方法能在 2h 内使目标 RNA 扩增 10^9 倍。

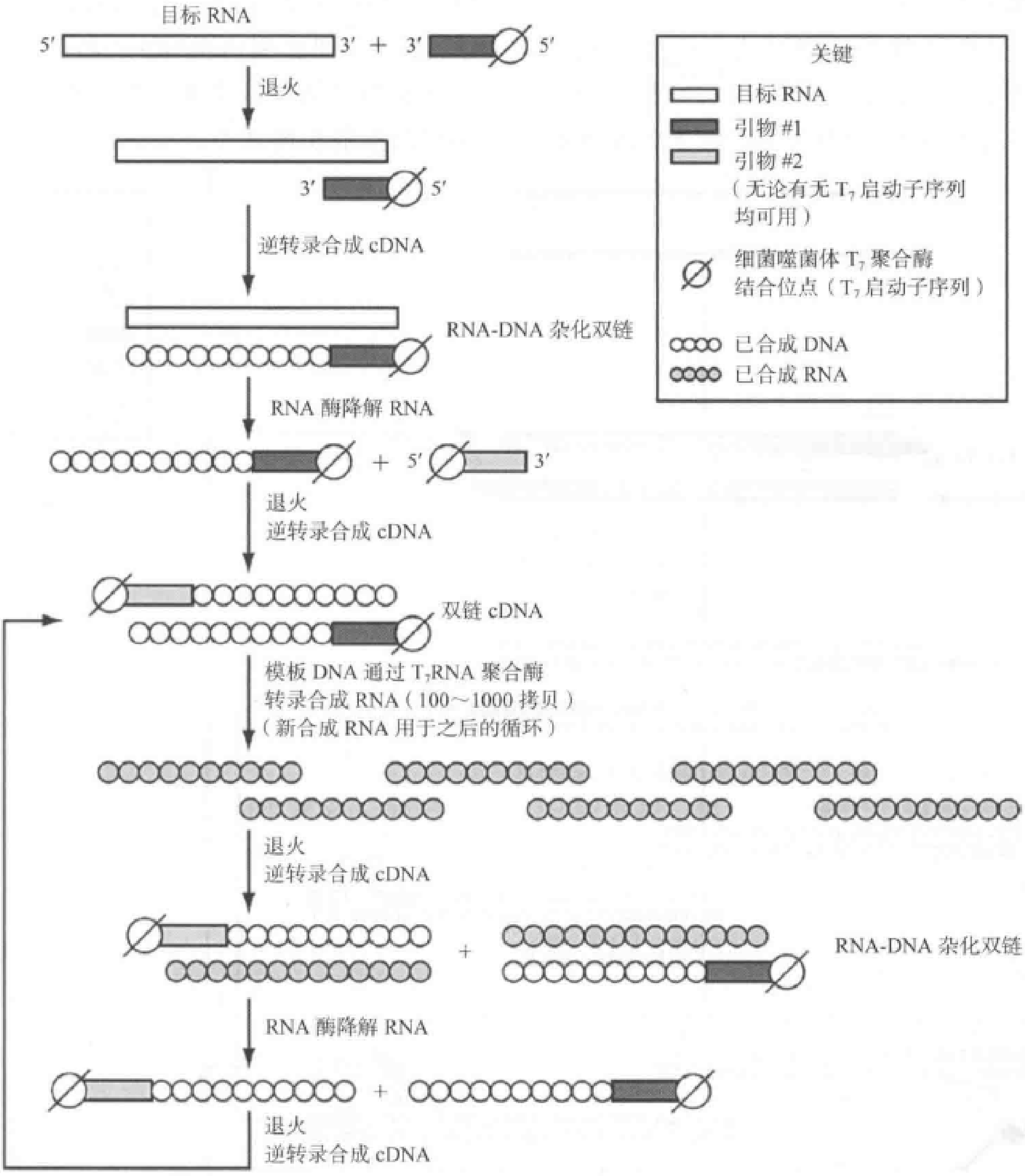


图 7-10 逆转录为基础的目标扩增。NASBA 和 TMA 是逆转录为基础的扩增系统的例子。获 Elsevier 许可，从参考文献[230]重印，见彩插

在 Hologic 检测系统中，TMA 的单链 RNA 产物用杂交保护分析法测定。用改良的快或慢的化学发光连续监测吖啶酯标记寡核苷酸探针，能在同一管内同时分析 2 个杂交反应的信号。在 bioMérieux（Durham，NC）仪器系统中，NASBA 产物是用三(2,2′-双吡啶)钌标记的杂交探针和电化学发光检测。NASBA 结合分子信标，创建出类似于 RT-PCR 那样的实时、动态扩增检测系统[73]。

逆转录扩增系统具有无须热循环仪、快速连续监测和单链 RNA 产物检测前不需变性等几个优点。此外，单管临床试验和 RNA 产物的不稳定性可能有助于将污染的风险最小化。其不足之处是用于 DNA 目标的检测表现不佳，以及与之相关的复杂的多酶系统不够稳定。

Hologic 开发的基于 TMA 的检测方法已获 FDA 批准，用于检测结核分枝杆菌、沙眼衣原体、淋病奈瑟菌、高危 HPV、HPV 16 和 18/45 基因型、阴道毛滴虫和寨卡病毒。此外，他们还拥有 FDA 批准的 HIV-1 和 HCV 病毒载量检测方法，该方法将 TMA 与单链探针、荧光素和淬灭剂结合起来，实现对扩增产物的实时检测。基于 NASBA 的定性和定量检测 HIV-1RNA，以及检测肠道病毒和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的试剂盒已不再市售。

(九)链置换扩增

链置换扩增（strand displacement amplification，SDA）是一种等温模板扩增技术，可用于检测微量 DNA 或 RNA 特定序列。正像其首次报道那样，SDA 曾被认为是在技术上存在某些局限性的简单的扩增过程[74]。然而，自从其最初报道以来，该技术已演变成一个高度灵活、技术简单但概念复杂的工具。BD Diagnostics 拥有 SDA 的知识产权。

在当前循环体系中，SDA 技术包括目标生成和目标指数扩增 2 个独立的阶段[75]（图 7-11）。两

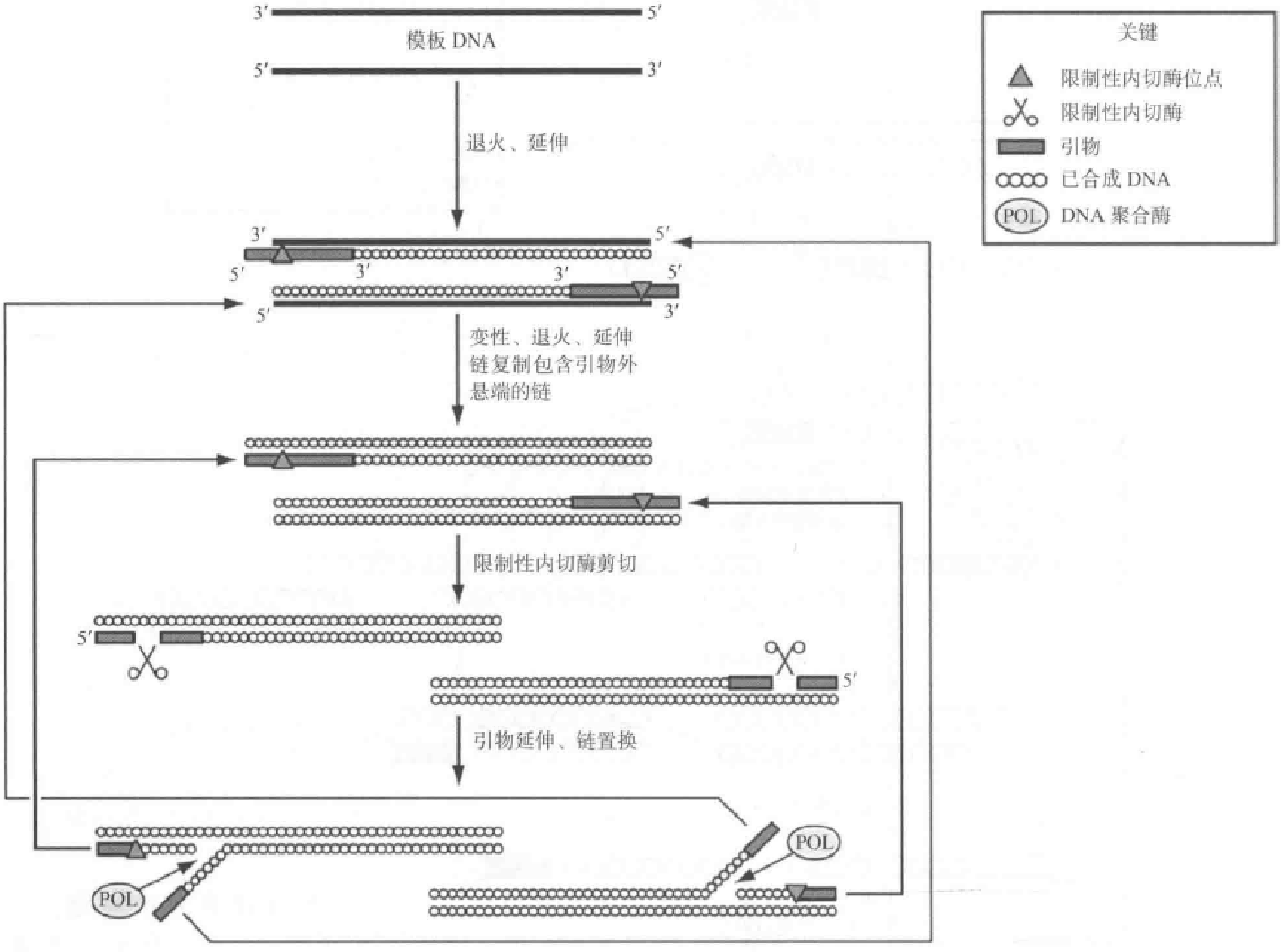


图 7-11 链置换扩增。所示为仅针对目标双链 DNA 中的一条链进行的反应，但扩增是在两条链上同时发生的。B1 和 B2. 链置换引物；S1 和 S2. 扩增引物（摘自参考文献[75]，并做部分修改），见彩插

者均在图7-11中进行了说明。在目标生成阶段，双链DNA变性后与链置换(bumper)引物对和扩增引物对结合。在扩增引物目标结合序列的5′末端包含了单链DNA限制性内切酶BsoB1的酶切位点。链置换引物较短，退火后结合到目标基因扩增区域的上游。在BsoB1、无外切酶活性的DNA多聚酶、dNTP混合物[含dUTP、dATP、dGTP和巯基dCTP(C_S)]存在时，链置换引物和扩增引物同时延伸并产生扩增产物。这一过程中移走了扩增引物的产物，此产物可作为链置换引物和扩增引物的互补链进行杂交。同时，反链引物延伸形成产物，并与第一次扩增引物延伸形成的产物互补结合，C_S也纳入BsoB1裂解位点中。此互补结合的产物进入目标反应的指数扩增放大阶段。BsoB1酶识别该双链的位点，但因为一条链中包含C_S，因此，它仅仅是被酶割破而非被酶切断。DNA多聚酶结合到缺口位置，开始合成一条新链，同时置换下游链。这一步再现了限制性内切酶识别半甲基化双链类型的序列，以及反复割伤和重复替换的过程。移出的链能与反链引物结合，对目标序列进行指数扩增。

这些单链产物也能与实时检测中的探针结合。用荧光素和罗丹明标记单链DNA分子作为检测探针。在标记的区域包括一个茎环结构，茎环包含BsoB1酶识别位点。目标特定序列的3′端用罗丹明标记。在没有特定目标的情况下，茎环结构保持荧光素与罗丹明密切接近，其结果是，在激发后仅检测到非常小的荧光发射。在SDA后，BsoB1酶切割将探针转换成双链类型，导致荧光素和罗丹明标记的物理分离，从而增加了荧光标记的发射。

SDA的敏感性高，能检测到少至10～50个拷贝的目标分子数[74]。使用针对结核分枝杆菌细胞内10个拷贝的重复序列而设计的引物对，其敏感性足以检测到细菌体内1～5个基因组的拷贝。SDA在加入逆转录过程后也能用于RNA的定量(RT-SDA)，引物与目标RNA杂交逆转录合成cDNA分子作为引物结合和链置换的模板，链置换的产物转入上述描写的扩增程序。RT-SDA已经用于HIV的病毒载量测定[76]。FDA已经批准BD Diagnostics的SDA在2个自动化平台(Viper LT和XTR)上用于直接测定泌尿生殖系统标本中的沙眼衣原体、淋病奈瑟菌及单纯疱疹病毒1型和2型。

SDA是一种不同于PCR的等温方法，不需要昂贵的热循环仪，在初始目标核酸变性后可以用单一温度进行；样品可以在单一的管中进行SDA，扩增时间从30 min到2 h不等。SDA的主要缺点在于，反应在相对较低的温度(52.5℃)进行，存在如基因组DNA那样复杂混合的情况时，可以发生非特异性的引物杂交。因此，当目标DNA丰度比背景基因DNA低的时候，非特异性扩增产物可淹没系统，降低该技术的敏感性。使用有机溶剂增加低温时的严格性和近期引入对热更稳定且有链置换作用的多聚酶，可以改善此问题。

(十)环介导扩增

环介导扩增(loop-mediated amplification，LAMP)是一种等温的方法，依靠*Bst* DNA多聚酶和4～6条引物自动循环链置换合成DNA[77]。2条内引物和2条外引物限定了目标序列，另又增加了一组环引物提高了反应的敏感性。LAMP反应的最终产物是类似于花菜一样有多个重复目标序列组成的环状结构的DNA分子(图7-12)[78]。此产物可通过监测反应管中的DNA扩增过程中由焦磷酸镁沉淀产生的浊度进行实时分析，也可以在琼脂糖凝胶中电泳后用溴化乙锭或SYBR green染色观察到。

很多实验室已成功开发出LAMP系统用于许多DNA和RNA病毒[79-82]的测定和分枝杆菌[83]感染的诊断。LAMP技术是一个等温的过程，不需要昂贵的设备，其阳性结果可以通过简单的浊度测量或肉眼观察。这些特点使它适合在资源匮乏地区和现场使用[84]。LAMP的引物设计比PCR更复杂，需要专门的培训和软件。在美国，Meridian Bioscience公司已经从Eiken Chemical公司获得LAMP技术许可，用于开发感染性疾病的诊断系统。Meridian公司的艰难梭菌、肺炎支原体、A群和B群β溶血链球菌、HSV-1和HSV-2，以及百日咳博特菌的试剂已经得到FDA的核准[85]。

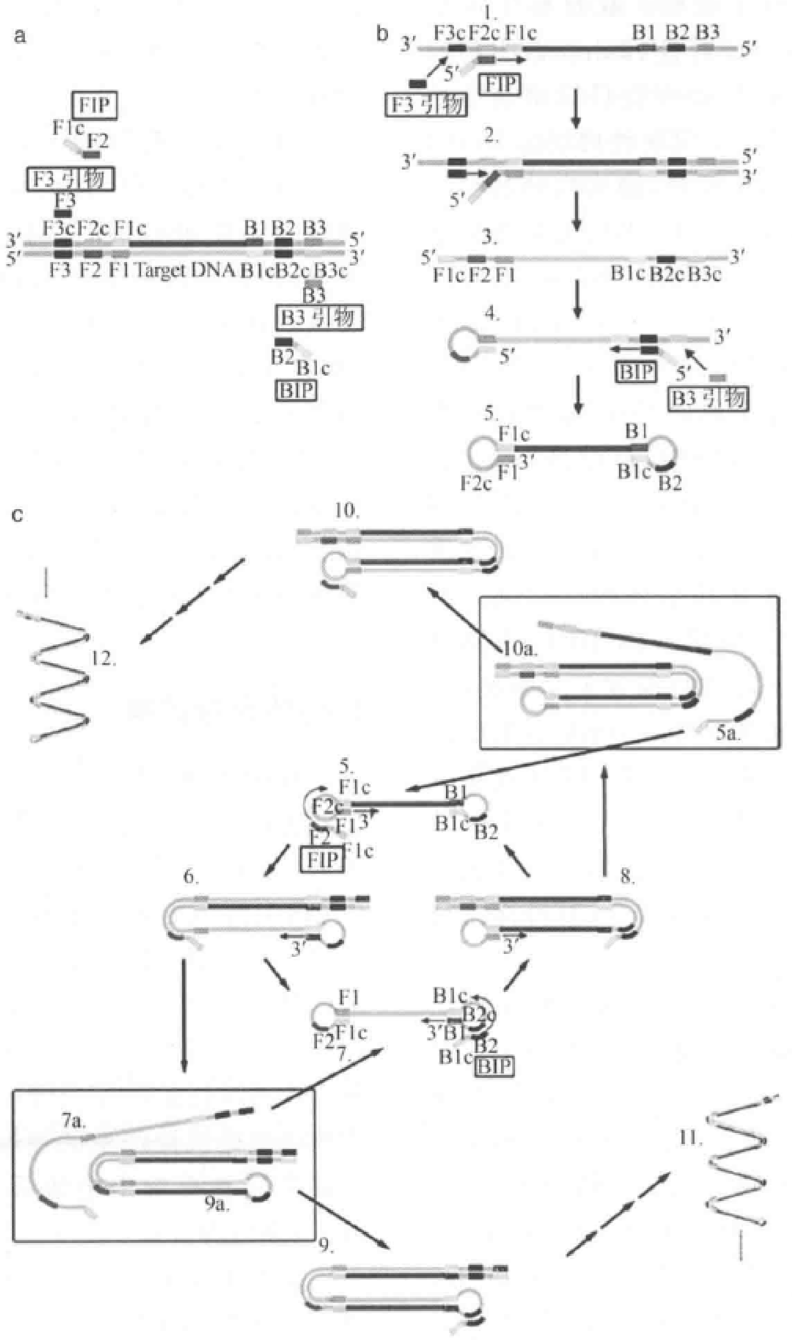


图 7-12 a. LAMP 反应的引物设计。简单地说，根据目标 DNA 上的 6 个不同区域设计引物，从 5′末端开始分别标记为 F3、F2、F1、B1c、B2c 和 B3。c 表示互补序列，F1c 序列与 F1 互补。LAMP 技术使用 2 个内引物(FIP 和 BIP)和 2 个外引物(F3 和 B3)。FIP(BIP)是包含了 F1c (b1c)序列和 F2(B2)序列的一种混合引物。b. 开始结构产生步骤。从 FIP 开始 DNA 的合成的过程如下，FIP 的 F2 区退火到目标 DNA 的 F2c 区域，启动延伸。BIP 以类似的方式扩增 DNA。F3 引物退火到目标 DNA 的 F3c 区，合成链置换核酸，将 FIP 延伸的 DNA 链置换并释放，释放的单股 DNA 在 3′端形成环结构(结构 3)，BIP 和 B3 引物以此单链 DNA 为模板进行 DNA 合成，如前所述，生成结构 5，它具有 2 个环结构末端(哑铃状结构)。c. 循环扩增过程。以自制的结构为模板，从 3′末端的 F1 区开始引物 DNA 合成，从 FIP 开始延伸，在环结构 F2c 区单链退火。通过几个步骤，产生了结构 7，结构 7 与结构 5 互补，再次通过结构 5 至结构 7 的过程，产生结构 8，结构 10 和 9 分别是从结构 6 和 8 产生，形成了更长的结构(结构 11 和结构 12)[11-12](获许可，从参考文献[78]重印)，见彩插

(十一)解旋酶依赖性扩增

解旋酶依赖性扩增(Helicase-dependent amplification,HDA)是由 BioHelix(Beverly,MA)开发的一种等温扩增过程,使用解旋酶分离双链DNA并产生单链DNA模板,通过引物杂交和DNA多聚酶进行后续延伸模板[86]。HAD反应中双链DNA由解旋酶以酶法解开,省略了PCR过程中最初的热变性和随后的热循环所需的步骤。DNA解旋酶和单链DNA结合蛋白将双链DNA的2条链分开,2条序列特异性引物各自与目标序列的两端杂交,引物通过DNA多聚酶进行延伸退火得到目标序列的双链DNA产物。2个新合成的产物用于下一轮扩增时解旋酶的底物。如此,与同时存在的链状反应一起,导致所选目标序列的指数扩增(图7-13)。

HDA与多种检测技术兼容,包括定性和定量荧光技术、实时PCR仪器[87]。此外,HDA具备发展为简单的、可用于现场或即时检验的便携式DNA诊断设备的潜力[88-90]。FDA已批准Quidel(SanDiego,CA)公司生产的基于HDA技术针对HSV-1和HSV-2、水痘-带状疱疹病毒、艰难梭菌、百日咳鲍特菌、阴道毛滴虫,以及A群和B群β溶血性链球菌的检测产品。

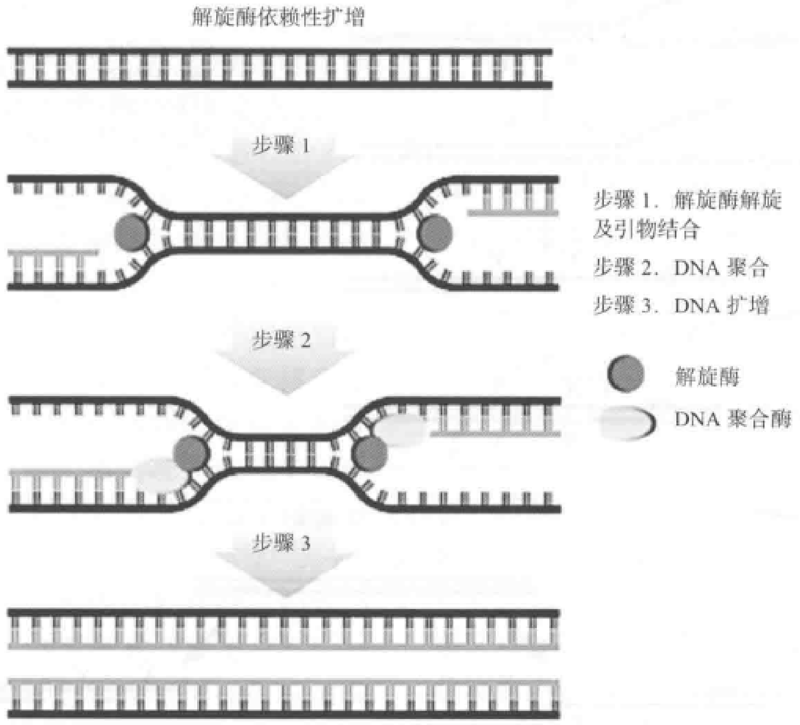


图7-13 HDA用2条特异序列引物从扩增目标序列的两侧开始扩增该片段,酶复合物用于DNA解链和聚合。HDA的第一步是解旋酶进入模板沿着目标DNA移动,破坏连接2条链的氢键。目标DNA区域在解旋酶作用下暴露单链,允许引物退火结合。DNA多聚酶在每条引物的3′端将游离的脱氧核糖核酸(dNTPs)加入,延伸产生2条DNA复制链。2条DNA复制链独自进入下一轮解旋酶依赖性扩增,结果目标序列呈指数扩增(由http://technologyinscience.blogspot.com/2013/07/helicase-dependent amplificationdna.html.许可重印),见彩插

(十二)缺口核酸内切酶扩增

缺口核酸内切酶扩增反应(nicking endonuclease amplification,NEAR)是一个等温扩增过程,由缺口酶[91]对双链DNA模板进行缺口切割开始(图7-14),然后,DNA聚合酶结合在缺口位点并解开模板。包含缺口酶识别位点的T2引物松散地结合到模板上,并由聚合酶催化延伸。第2个T2引物与相同的位点结合并延伸,取代第1个T2引物。T1引物的模板特异性区域与释放链上的互补区域结合,并延伸到5′端,产生双链,完成NEAR扩增双链体。引物中的缺口酶位点可以重复该过程以快速扩增产物。

FDA批准Alere(Waltham,MA)公司生产的针对呼吸道标本甲型和乙型流感病毒的直接检测产品就是基于NEAR的方法,以供非实验室人员

床旁使用。因此，作为首个 CLIA 豁免的核酸扩增试剂，它被视为分子诊断领域的一座里程碑。ALERE 还拥有 CLIA-豁免的呼吸道合胞病毒和化脓性链球菌的核酸扩增试剂。

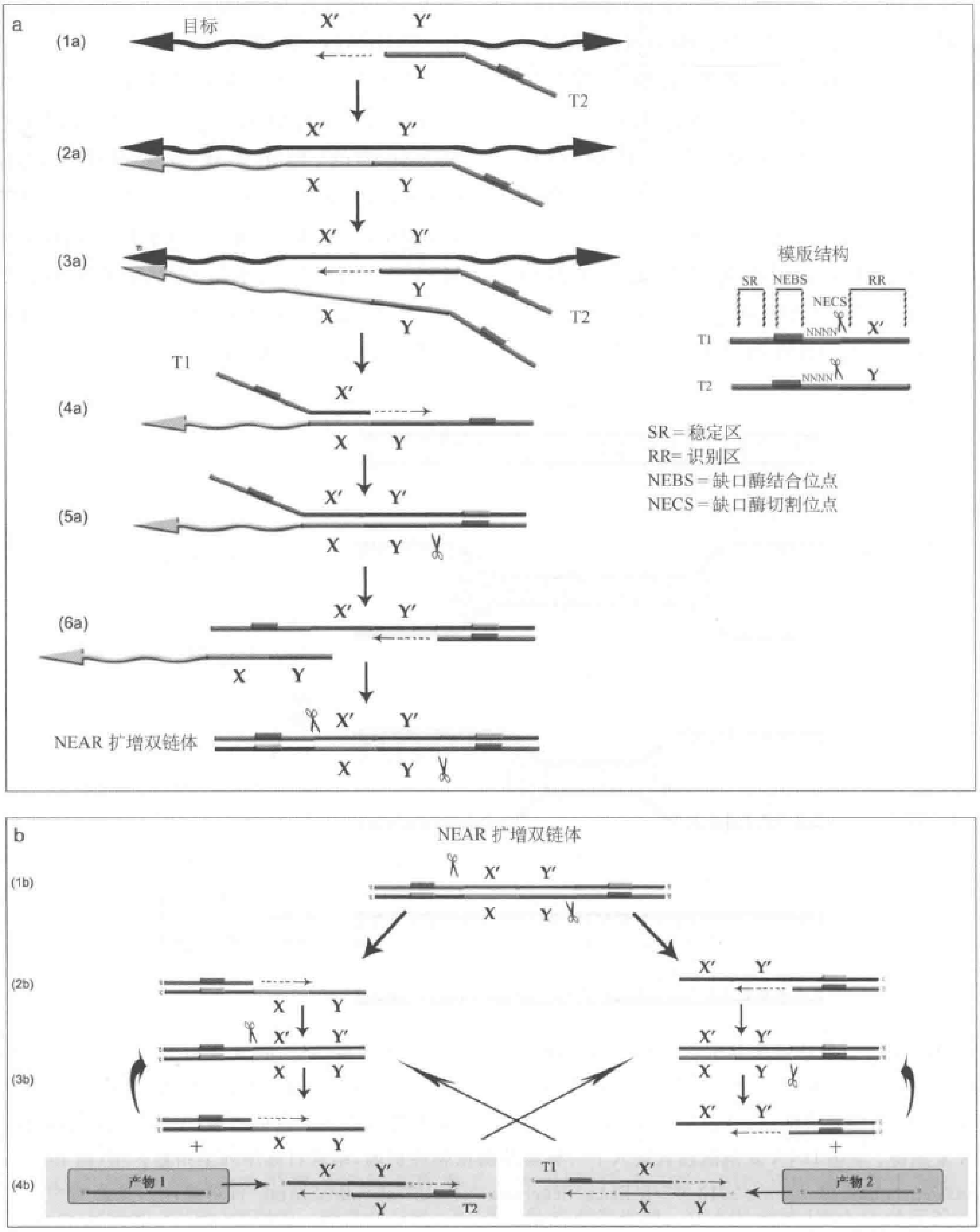


图 7-14 NEAR 机制

注：a. NEAR 扩增双链形成机制。(1a 和 2a)T2 的识别区与互补目标区结合，并通过聚合酶沿着目标延伸；(3a)第 2 个 T2 引物与相同的位点结合并延伸，取代第 1 个 T2 引物；(4a)T1 的识别区与其释放链中的互补区结合并延伸至 5′端，产生双链缺口酶识别位点；(5a)缺口酶结合和缺口切割（"剪刀"图形所示）；(6a)聚合酶沿着被切割出的 T1 引物 3′OH 继续合成，置换剩余的目标互补链，最终延伸形成的双链复合物称为 NEAR 扩增双链体。b. 产物生成机制。(1b 和 2b)缺口酶结合到 NEAR 扩增双链体上的 2 个缺口酶识别位点；2 个位点的切割和链置换扩增产生一对复合物，每个复合物由双链稳定区、缺口酶识别区和单链目标组成；(3b 和 4b)重复切割、聚合和链置换导致产物 1 和 2 的扩增；剪切后的复合物可再生(3b)，而产物 1 和 2 可以分别退火形成 T1 和 T2(4b)，导致双向延伸并形成双链体，双链体在剪切后产生相对的产物；产物继续循环，直到模板、dNTP 或酶耗尽（经许可，从参考文献[91]重印），见彩插

五、扩增产物的测定和分析

(一)凝胶分析

早期扩增产物的检测是在琼脂糖凝胶电泳后，用溴化乙锭染色肉眼观察。电泳后也常将DNA转移到硝酸纤维膜或尼龙膜上，采用特异性探针杂交以提高测定的敏感性和特异性。结合了放射性标记探针的膜和X线胶片紧贴一起，杂交体在胶片上显示为黑色的条带；酶标记的探针可以通过适当的化学发光或色原性底物产生可测量的光强度或颜色的变化。这些非同位素方法中，许多技术敏感性至少和同位素类似但速度更快。此外，酶标记的探针也更稳定。尽管凝胶电泳和印迹仍然是重要的研究工具，但是在临床实验室，这些技术正在被更快、更简单的方法所替代。

单链构象多态性(single-strand conformation polymorphism，SSCP)分析和限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism，RFLP)分析已用于确定凝胶中可见的扩增产物的碱基组成。在SSCP分析中，PCR产物变性后在非变性凝胶中电泳[92]。PCR产物物理构象的变化与碱基组成有关，这些产物在凝胶电泳中可呈现不同的迁移率。这项技术已成功地用于检测突变导致的结核分枝杆菌对利福平的耐药性[93]。

RFLP分析采用限制性内切酶在特定的识别位点上切割扩增产物。切割后的片段通过电泳分离开来，而后产生的各种条带谱型可提供有关核酸序列的信息。当RFLP分析配上杂交反应，它还可以提供与探针同源基因的位置和数量。短产物的SSCP和RFLP分析已很大程度上被更先进的、更便宜的直接测序技术所取代。

(二)毛细管电泳

毛细管电泳法(capillary electrophoresis)可在单碱基水平，准确分辨荧光标记的50～1000碱基组成的核酸长度。PrimeraDx(Mansfield，MA)已将PCR和毛细管电泳整合成具有多重检测功能的系统，此系统可根据扩增产物特定的大小，同时检测多达60个目标[94-95]。

PrimeraDx结合PCR和毛细管电泳，已开发出同时检测CMV、HSV、BK病毒、人类疱疹病毒6型(human herpes virus-6，HHV-6)和HHV-7病毒载量的体系。在此系统中，通过从PCR系列循环取样、毛细管电泳分离和定量PCR产物而完成目标核酸扩增的监测。这些数据用于绘制扩增曲线。和实时PCR扩增类似，此系统通过每个目标指数扩增期的扩增曲线来确定循环数的阈值。与RT-PCR使用独立的标准品不同的是，在PrimeraDx系统中，每个反应使用多个内部标准生成的校准曲线，并与多重反应中的每个单独的检测相匹配。目前已开发出真菌和呼吸道病毒的定性检测。PrimeraDx的ICEPlex系统是一个自动化的高通量的能实施多重RT-PCR和毛细管电泳的设备。

(三)比色微孔板系统

比色微孔板(colorimetric microtiter plate，CMP)是替代传统的凝胶和印迹技术、用于检测扩增产物的方便的系统。在此系统中，包被在微孔板表面的特异性寡核苷酸探针捕获扩增产物，加入酶结合物及相应的基质后，检测结合了产物的孔的颜色变化。这些系统类似于临床实验室中通用的酶免疫测定，它使用微孔板洗涤和读取结果。CMP系统比上面描述的传统膜杂交技术更实用、更快速。

已有几个商品化的CMP系统可供选择。常用的方法是用生物素标记的引物扩增目标核酸，含有生物素产物变性后加到微孔板中。捕获探针杂交后，结合的产物用链霉亲和素-酶结合物和显色底物进行检测[96]。在CMP系统中也有使用酶结合抗dsDNA检测PCR产物[97]。另一种方法使用地高辛-dUTP标记PCR产物而用地高辛抗体酶结合物检测捕获的产物[98]。随着实时扩增和检测系统的发展和广泛使用，CMP系统现已很少用于临床实验室。

(四)等位基因特异性杂交

Innogenetics/Fujirebio(Ghent，Belgium)采用线性探针用于HCV、HPV和HBV的基因分型、分枝杆菌的鉴定、HBV和结核分枝杆菌耐药突变分析[99-104]。这些分析系统中，一系列带有poly(T)尾巴的线性探针吸附在硝酸纤维素条上，生物素标记的PCR产物与固定在条上的探针杂交。在严格的杂交条件下，标记的PCR产物与探针序列完全匹配杂交。杂交后，加入链霉亲和素

标记的碱性磷酸酶和生物素结合。与碱性磷酸酶底物一起孵育后呈现紫色沉淀结果。这种杂交模式提供了扩增产物的核酸序列信息，能够检测单核苷酸多态性。

Roche已经在欧盟注册使用37种HPV基因型的线性探针[105]。采用针对HPV基因组L1区域目标的生物素标记引物和多重PCR，以及固定于硝酸纤维素膜上的线性阵列L1序列特异性探针。杂交的模式能提供基因型结果，测定的方法如上所述。

(五)核酸测序

PCR结合Sanger双脱氧核苷酸链式终止法可用于测定临床样本的DNA序列[106]。毛细管电泳技术在PCR和双脱氧链终止的产物分离中的应用已经简化了测序过程中的许多步骤，使得该技术更适合用于诊断[107]。目前自动化Sanger测序的检测方法是用毛细管电泳根据荧光标记的DNA片段的大小来区分。核酸片段的不同荧光标记是由激光扫描检测在填充凝胶的毛细管中成单行通过的单个片段获得。由计算机收集信息产生色谱图，用不同的色彩表示4种碱基，如此可以确定模板DNA序列。通常自动化Sanger测序方法能准确地测定800 bp的DNA序列。想获得一个较长DNA片段的完整序列，必须要把它分成更小的片段，然后分别测序。这通常是用随机(鸟枪测序)或渐进式测序(引物步移)来完成。

ViroSeq HIV-1基因分型系统(Celera Diagnostics，Alameda，CA；由Abbott Molecular，DesPlaines，IL经销)也使用双脱氧链终止法测序，但每个双脱氧核苷酸标记不同的荧光染料。每个反应混合物含有1个引物和所有4个独特标记的双脱氧核苷酸。采用毛细管电泳分离终止的PCR产物。

尽管采用毛细管电泳法进行PCR产物直接测序是一种功能强大的研究工具，但是在临床实验室常规应用该技术，取决于高通量集成数据库和数据分析软件系统的开发。这样的系统可用于HIV-1和HCV基因分型和通过rRNA基因序列分析鉴定细菌和真菌。

焦磷酸测序(Qiagen，Hilden，Germany)是一种可替代传统测序方法、用于基因分型和短读长DNA测序的技术[108]。焦磷酸测序是基于在DNA合成过程中产生的焦磷酸的发光检测技术。

一个测序引物与一个单链扩增子杂交，并与DNA多聚酶、ATP硫酸化酶、荧光素酶、三磷酸腺苷双磷酸酶、底物5′腺苷酰硫酸和荧光素一起孵育。4种dNTP的第1个dNTP加入到反应混合物后，DNA多聚酶催化dNTP掺入DNA链中。每掺入一个核苷酸就伴随着焦磷酸的释放(PPi)，其数量等同于掺入的核苷酸数量。ATP硫酸化酶在5′腺苷酰硫酸的存在下定量将PPi转换为ATP。ATP驱动荧光素酶介导转化荧光素为氧化荧光素而发光，发光的总量与ATP的含量成比例关系。电荷耦合器件相机检测反应中产生的光。核苷酸掺入的数量与程序图上每个峰的高度成比例。三磷酸腺苷双磷酸酶是一个核苷酸降解酶，它不断降解ATP及没有掺入的dNTPs。这种降解关闭了发光，使反应溶液再生。添加下一个dNTP，重复上述过程。

焦磷酸测序已广泛应用于微生物学领域，包括耐药性突变的检测和细菌、病毒、真菌的鉴定和分型[109-112]。不同于传统的测序策略，焦磷酸测序对测序引物末端相邻序列提供了可靠的数据。焦磷酸测序提供了一个使用简单和强大的短读长测序平台。

自2005年以来，出现了多个新的测序技术平台，这些平台在增加全序列产品和降低成本方面已经大大超越传统的双脱氧链终止法。总的来说，这些新的测序方法称为下一代或大规模并行测序，在临床诊断方面具有相当大的潜力[113-115]。在这里描述的下一代测序平台主要包括Roche 454 GS-FLX(454Life Sciences，Branford，CT)、Illumina HiSeq和MiSeq(Illumina，San Diego，CA)、ABI SOLiD(Applied Biosystems)和Ion Torrent(Life Technologies)。这些平台的测序方法、读长、覆盖深度、运行时间、每个循环的碱基总数、测序的精度、可用性和成本各不相同。Roche 454平台，利用如上所述的焦磷酸测序技术，同时在独立的磁珠上进行成百上千个测序反应。其工作流程如下，首先，目标DNA随机剪切成片段，而后与接头连接；单链模板DNA分离后与磁珠混合、乳化，形成油包水的混合物，每个磁珠上的模板进行独立扩增；最后，将磁珠分配到包含数以百万计的小孔的“picotiter板”，每个孔接受一个单独的磁珠，这构建了每个模板测序的一个独立环境，

可同时对不同的模板进行大规模并行测序。

Illumina公司的DNA测序是将模板与适配器联结，该适配器包含了与以共价键连接在流动细胞表面的锚定寡核苷酸的互补序列，退火后与锚定寡核苷酸结合。模板DNA分子由改良的称为“桥式PCR(bridge PCR)”的等温PCR方法进行克隆扩增，其中的DNA分子自由弯曲，与相邻的锚定寡核苷酸形成一座桥。桥式扩增在固体表面上产生了扩增模板簇，其中每个簇表示不同的模板；随后，该簇通过变性形成一个单链模板，此模板与测序引物杂交。它采用独特的荧光标记，可逆地终止核苷酸的化学测序法。用不同颜色的荧光基团标记核苷酸，使所有4个核苷酸可以同时添加到反应中。在一个测序周期中，每一个序列只掺入一个终止核苷酸，记录每个簇中掺入序列中的荧光标记颜色。除去核苷酸上的终止组，只允许加入下一个互补的核苷酸，重新开始新的周期。

ABI SOLiD系统的化学作用从改良的适配器单链DNA分子悬液PCR开始。PCR后将模板变性，选择带有扩展模板的珠子进行富集。将选定珠子上的模板3′端进行修改以允许其与玻璃片共价结合，修改后的珠子随机沉积在玻璃片上。用连接的方式进行测序，引物与文库模板内的适配器序列杂交，4个为1组的荧光标记双碱基探针竞争与测序引物连接。该双碱基探针的特异性通过查询每一次连接反应的第1个和第2个碱基而实现。随着多个循环的连接、检测和切割的进行，循环数的多少确定最终的读长。经过一系列的周期，除去延伸产品，模板恢复与引物在n-1的位置互补结合，开始第2轮的连接循环。通过5轮的引物重置后完成对每个序列标签的测序，因此，每个碱基会由2个不同的引物进行2次独立的连接反应得到验证。这种双重验证提供高精度的序列测定。

Ion Torrent系统采用集成电路直接进行非光学大规模并行DNA测序方式[116]。基因组DNA切割成片段并连接到适配器，与适配器连接的文库在2 μm的丙烯酰胺珠上克隆扩增。通过磁性富集带有模板的珠子。测序引物和DNA多聚酶与模板结合，移进离子芯片的装载孔中。该芯片含有数百万传感器孔。通过离心机旋转将单个珠加载到芯片单个传感器孔中，每个孔的深度只允许容纳1颗珠。

在离子测序的运行过程中，4个单核苷酸自动逐一添加。当流动的单核苷酸与测序引物下游的模板碱基互补时，多聚酶将该单核苷酸纳入到新生链中。1个或更多个与测序引物下游模板互补的碱基掺入使测序引物的长度增加，加入的核苷酸三磷酸水解导致这个过程中每纳入1个核苷酸就释放1个质子。释放的质子使周围溶液的pH发生变化，与液流中掺入的核苷酸的数目成正比。每个孔底部的传感器检测该孔的pH变化，转换成电压，并通过片外的电子器件进行数字化。每次核苷酸流过后，都会清洗，确保核苷酸不残留在孔中。信号处理软件通过使用物理模型将原电压转换为基准线，对每次连续核苷酸流掺入每个小孔中测得的原始数据进行转换。该技术用最常见的方法构建集成电路，使制造商能够生产更具可扩展性和成本较低的产品替代目前许多可用的大规模并行测序系统。

下一代测序将对基因组学研究产生重大影响。在医学微生物学领域，测序技术已应用于宏基因组学、微生物鉴定和罕见突变的检测中。超深度测序(ultradeep sequencing)可以检测罕见的低至1%的病毒变异体，比传统的Sanger测序方法有更深度水平，而检测这些低丰度的耐药突变可显著影响HIV-1和HCV感染的治疗效果[117-119]。CLSI最近已经制定了临床实验室核酸测序指南[115]。

(六)杂交阵列

1. 高密度阵列 通过以精确模式，在固体支持物上附着或合成成百上千的寡核苷酸而形成了高密度DNA杂交阵列。一个标记的扩增产物与探针杂交，杂交信号映射出阵列中的各种位置。如果探针的数量足够多，PCR产物的序列便可以从杂交模式(测序阵列)中推导出来。许多生产商已经开发出高密度DNA微阵列及分析数据所需的仪器，包括Affymetrix(Santa Clara，CA)、Roche NimbleGen(Madison，WI)和Agilent Technologies。杂交阵列在微生物和宿主基因的表达分析、病原体鉴定、耐药性检测、发现病毒、分子监测、菌株分型和诊断测序等方面应用广泛[120]。CLSI出版了诊断核酸微阵列的使用指南[121]。

将一种用于计算机行业半导体制造的光刻技术(Affymetrix,Santa Clara,CA)应用到核酸化学合成领域取得了重大进步。这种方法使用光去指引硅晶片上短寡核苷酸(20～25 bp)的合成[122]。在一个15 mm^2 的芯片上,可以建立数以千计的独立位点或区域。在光激活化学的时间内,每个区域将单个核苷酸组装成特定的寡核苷酸。

NimbleGen的方法类似于Affymetrix,在硅晶圆的原位合成寡核苷酸探针,但光刻掩模(photolithographic masks)用虚拟或数字掩模代替。阵列合成器采用可编程微镜像阵列创建数字掩模,反射所需的紫外线图案到脱保护的区域,下一个核苷酸将会加到探针上,直到大小为85 bp。每个阵列包含$>10^6$ 个区域。

安捷伦微阵列使用玻片和喷墨印刷,这就不需要光刻或数字掩模。原位合成60 mer的寡核苷酸是通过使用5种"墨水"(4个碱基加催化剂)来印刷核苷酸前体并组装和去保护[120]来实现的。安捷伦芯片有很多种规格,最高规格达244 000的区域。

鉴于化学合成的复杂性和原位合成阵列的生产费用,目前只有少部分制造商能生产。因此,它们不适宜于用户自定义或实验室开发的应用程序。

另一种用机械装置生产DNA杂交阵列的方法是采用精密微穿刺技术(the precise micropipetting)将预制的dsDNA探针(通常长度为200～2000 bp)固定在载玻片上[123-124]。这些阵列的大小和密度不适合用于突变检测,但可用于基因表达谱的测定,它可以同时确定数千个基因(mRNA水平)激活的状态。将该阵列用于分析病原体的基因表达谱,可能为研究致病机制、确定新的治疗方案和疫苗靶标提供新的思路。

高密度微阵列结合非测序PCR也用于病原体的发现和鉴定,并有可能提供快速的、正确的感染性疾病的鉴别诊断。Wang等描述了第1个用于检测大量病毒的微阵列[125],包括140种病毒的1600个70 mer的寡核苷酸探针,每种病毒平均10个。检测结果表明,该阵列能检出许多种病毒,敏感性和特异性与各自特异的PCR检测相似[126]。此外,这种方法有助于从人类和动物中发现很多新的病毒,包括严重急性呼吸综合征冠状病毒[127]。Panviral微阵列的当前版本包含代表GenBank中所有的病毒种类的60 000个探针。诊断微阵列领域正在迅速发展,已有文献报道了多个具有广泛范围的微阵列[128-131]。

不同的阵列类型,样本制备方法各异,但均具备一些基本的特征。所有的方法都从提取总RNA、poly(A)或基因组DNA开始,然后采用酶学方法转换成cDNA或cRNA,再将标记样品适当扩增或掺入以生物素或荧光素标记的核苷酸。此技术应用在基因表达时,扩增过程必须保持不同转录子的相对丰度,而用于基因测序时,相对丰度信息几乎没有意义。流动池中的核酸阵列与样品杂交2～12 h后,采用激光共聚焦显微镜扫描阵列表面的荧光强度。显微镜自动扫描只需几分钟即可获得整个阵列的表面图像,计算机软件分析该荧光图像,并确定样品中核酸序列或基因表达谱。

高密度微阵列在分子诊断具有很好的前景,然而,阵列制造的复杂性、有限的商品化产品和高昂的测试成本均阻碍了该技术常规应用于临床实验室。

2. 低或中密度微阵列 新型检测技术和简化方法的最新进展,促使昂贵的高密度阵列向成本效益好的、用于临床诊断的低到中等密度的系统过渡。下文描述的3个微阵列系统都是FDA批准的平台。

Infiniti分析系统(AutoGenomics,Carlsbad,CA)是全自动多重检测平台,此平台使用新型BioFilmChip微阵列,广泛应用于分子诊断。荧光标记的PCR扩增产物与固定在BioFilmChip微阵列上的探针杂交。该微阵列以薄膜为基础,由聚酯固体支撑上的多层薄的水凝胶组成。阵列上的每个点由内置的激光共聚焦显微镜扫描。该系统能集成控制所有步骤,并自动处理和分析数据。在感染性疾病中,仅作为研究使用(research-use-only,RUO)的阵列包括结核分枝杆菌耐药性、呼吸道病毒、性传播疾病病原和非结核分枝杆菌的检测[132]。

Verigene系统(Luminex)采用金纳米粒子标记的探针来探测玻璃片上与捕获寡核苷酸阵列杂交的目标核酸。金纳米粒子探针与捕获的目标DNA杂交后进行银信号的放大。Verigene的光学阅读器扫描玻片上的银信号,处理数据并产生定量结果。目前已获FDA批准的Verigene系统

检测试剂包括：呼吸道病毒、鲍特菌属某些种、革兰阳性细菌、革兰阴性细菌、阳性血培养瓶中筛选耐药基因、艰难梭菌及肠道致病菌检测板[133-134]。

eSensor 系统(GenMark Dx,Carlsbad,CA)是以电化学测定为基础的 DNA 微阵列[135]，它由 76 个镀金电极阵列组成了一个印刷电路板，每个电极由一个多组分、自我组装的单层结构修饰而成，此单层结构包括预先合成的寡核苷酸捕获探针。核酸检测是基于夹心法的原理，信号和捕获探针设计成与相应目标序列上的直接相邻区域的互补序列。捕获探针、目标序列和信号探针三者之间形成序列特异杂交体。这个过程使具有电化学活性的二茂(络)铁标记的信号探针的 5′端密切靠近电极表面。

每个二茂(络)铁组的亚铁离子发生周期性氧化还原，导致失去或获得一个电子，使电极表面的电流产生变化，用交流伏安法测量，通过高阶谐波信号分析可以将二茂铁依赖的感应电流从电容电流的背景中分辨出来。

eSensor 墨盒由 1 个印制电路板、1 个盖板和 1 个微流体件组成。该微流体组件包括 1 个膜片泵和 1 个弯曲通道上的止回阀，这使电极阵列上形成了杂交通道。eSensor 仪器包含了 1 个基础模块和 3 个墨盒处理塔，而每个塔具有 8 个墨盒槽。每个墨盒插槽独立运作。一个三塔的系统，8 h 内可完成 300 次测量。eSensor 系统检测 14 种不同类型和亚型的呼吸道病原体的检测板已获 FDA 批准[136]，HCV 的基因分型试剂盒可作为研究之用。GenMark 的 ePlex 系统是一个简单的从标本到结果的系统，能在 1 h 内测定 20 种上呼吸道病原体，已获得 FDA 批准，其原理是用电化学的方法测定多重 PCR 产物与 DNA 阵列杂交的结果[137]。血培养鉴定和胃肠道病原体的检测板正在 ePlex 的发展计划中。

(七)质谱

质谱技术应用在病原体的鉴定和鉴别是临床微生物学最令人振奋的进展之一[138-139]。关于质谱的更多信息见本书第 5 章。所有的质谱都是基于直接测量分析物的分子量和电荷。质谱仪由 3 个功能单元组成，第 1 单元为离子源，用于将分析物电离然后转移到气相；第 2 单元是质量分析器，根据离子的质量/电荷比进行分离，质量/电荷比决定了这些分析物的飞行时间(TOF)，该分析仪可以使用真空室和静态或动态磁场或电场来分离离子；第 3 个单元使用电子倍增器或快速示波器来检测离子。有多种电离方法可以使用，而蛋白质和核酸太脆弱，以至于不能用过去传统的方法进行离子化，但是基质辅助激光解吸电离(matrix-assisted laser desorption ionization,MALDI)和电喷雾电离(electrospray ionization,ESI)适用于蛋白质和核酸的分析。

将整个细菌细胞进行 MALDI-TOF MS 分析来鉴定细菌和真菌的方法，大大减少了通过培养后再鉴定所需的时间。越来越多的临床实验室采用该项技术。2 家商用系统 MALDI Biotyper (Bruker daltronics, MA) 和 VITEK MS (bioMérieux)获得 FDA 批准，本书第 5 章有详细叙述。MALDI-TOF 和 ESI MS 也可以用于 PCR 扩增产物的分析。2 个完全集成的系统 Ibis Biosciences/Abbott Molecular(Carlsbad,CA)和 Sequenom(San Diego,CA)已用于感染性疾病中，其描述如下。

T5000 Universal Biosensor/PLEX-ID(Ibis/Abbott Molecular)是能用于大多数病原体鉴定和鉴别的商品化检测系统[140]。在此系统中，将临床样品中所有的核酸提取并分装到微量滴定板的孔中，每个孔中包含 1 对或多对 PCR 的广谱引物。针对需要的微生物群如所有的细菌、特定的种或个别菌株等设计引物。PCR 产生了混合的产物，这体现了临床样品中的微生物菌群的混合存在状态。

PCR 产物进行脱盐和依序电喷到质谱仪上进行 TOF 分析。质谱仪测定并精确处理每个 PCR 产物质量的质谱信号，并明确地推断其碱基组成。利用多重 PCR 中混合碱基的成分，可以确定样品中病原体的种类及相对浓度。虽然它不直观，但基因组中特定区域的核酸组成(例如，As、Gs、Cs 和 Ts 的数量)如同核酸的序列一样，所提供的信息量同等重要。MS 非常灵敏，基本上在瞬间可以从含有少量核酸的复杂混合物中测量核酸的质量和确定碱基的组成。

Ibis 系统的一个关键部件是专门用于筛选数千生物体相关引物的基因组学数据库。广谱 PCR 能够产生针对微生物群而不是单个种的产物。再加上质谱仪能快速准确地获得 PCR 扩增产物碱

基组成的能力，提供了很高的信息含量，省却了需要预先估计样品中可能存在的病原体种类的过程。Ibis 系统已用于各种细菌、病毒、真菌和原生动物的快速鉴定和菌株分型。T5000 Universal-Biosensor/PLEX ID 系统已不再上市销售，Abbott 在 2014 年推出了一款新的 IRIDICA 系统，该平台包括一种可于 8 h 内直接检测血液样本细菌、念珠菌基因，以及 4 种特异性抗生素耐药标志物的检测方法[141]。然而，雅培 IRIDICA 平台目前也已不再上市销售[142]。

Sequenom（现在是 Agena Biosciences，San Diego，CA）采用碱基特异性裂解和 MALDI-TOF MS 的比较测序技术，开发了全自动的 iPlexMassArray 高通量微生物 DNA 序列分析系统[143]。在这个创新的基因分型方法中，PCR 扩增的信号序列体外转录并由 RNase A 进行碱基特异性 RNA 裂解。由此产生的 RNA 裂解片段的混合物作为一个复合体形成质谱信号图，作为该微生物的指纹图。每个 RNA 复合体的核苷酸组成是由 3′末端的裂解碱基和质谱测定的质量来确定的。

复合体质量的检测结果是通过与经计算机模拟处理的系统数据库中一组参考序列的分子量计算列表相比较得出的。最佳匹配的参考序列用来作为鉴定微生物的参考集的模拟模式。此序列与样本序列之间的小差异显示为电脑数据库和样品检测谱之间的差异。它们可以用来识别和定位单一碱基变化的序列差异，并确定新的序列。根据目标基因，MALDI-TOF MS 可以提供单一微生物分类单元的高水平鉴别或者用来识别种内的谱系[144-148]。

六、定量方法

上面讨论的许多方法可以用来量化临床样本中的 RNA 或 DNA 的量。最常用的方法包括 PCR 和 RT-PCR 技术、转录扩增和 bDNA 分析。定量方法的原理是加入的模板量与所产生的产物量或信号量之间有线性关系。竞争 PCR（Competitive PCR，cPCR）是一种可靠的和强有力的方法，在临床实验室普遍使用的第一代 HIV-1 和 HCV（Amplicor Monitor System；Roche Diagnostics，Indianapolis，IN）病毒载量检测试剂的基础即为 cPCR。目前，这些终点分析方法正在迅速被实时扩增的方法所取代。cPCR 的基本原理是：在同一反应管中，将目标模板和校准模板共同扩增，校准模板与目标模板长度相同或相似，并具有与目标模板相同的引物结合序列[149]。因为 2 个模板都用同一对引物扩增，因此，保证了热连续监测特性和扩增效率的一致性。校准品的量必须是已知的，扩增后 2 种模板的产物必须能够相互区分开。目前，不同类型的校准品已用于 cPCR，但大小和碱基组成与目标模板类似的校准品最为有效。定量逆转录 PCR 应采用 RNA 竞争法，以解决逆转录效率不同的问题。这种基于逆转录扩增方式的竞争性扩增方法也总是使用 RNA 靶标和 RNA 的校准品。

实时 PCR 与逆转录扩增的方法是最常见的定量方法。实时扩增和检测的方法所产生的荧光信号量与原始样本中目标 DNA 和 RNA 的浓度成比例，因此，特别适用于核酸的定量。与标准 PCR 测量终点信号的方法不同，实时 PCR 的信号测量是在指数扩增阶段过程，从扩增图上与基线的交叉点开始（图 7-6）。在指数扩增期测量荧光信号有很多优势，反应的成分没有限制，并且不容易受抑制剂的影响，比标准的 PCR 有更好的重现性。内部和外部校准品可用于实时检测，由于实时检测精度的提高，使用外部校准曲线可获得比标准 PCR 更可靠的结果。把外部校准品以系列浓度（以 10 为底）对数值对应其 C_T 值绘制校准曲线，用于计算样品中的核酸浓度。样品中核酸的浓度与 C_T 值呈负相关，核酸浓度越高 C_T 值越低[42]。在一般情况下，实时 PCR 并没有比标准 PCR 更敏感，但有一个更宽的线性范围，通常为 6～7 个数量级。

数字 PCR 是核酸定量分析的一大进步，其具有比实时 PCR 更低的检测下限，在非常低的浓度情况下有较好的准确性，无须参考标准即能提供绝对定量。目前，数字 PCR 作为一个研究工具，如果该项技术变得不那么昂贵，它也许能在临床实验室得到应用，以解决实时 PCR 检测中模棱两可的定量结果，以及创建准确的病毒参考标准[67-68,150]。CLSI 发布了感染性疾病的分子定量方法指南，以解决定量 PCR 的应用和进展，以及其他一些核酸扩增方法[151]，对于发布定量数字 PCR 实验的指南也已经列出了所需的最少信息[152]。

七、自动化和仪器

分子检测包括3个主要步骤：标本处理、核酸扩增和产物检测。样品处理通常是劳动最密集的一步，对于自动化检测系统制造商来说，它代表了最大挑战。在过去几年中，这方面已有相当大的进展，有一些半自动和全自动的系统可用。核酸提取过程自动化具有易于使用、仅限于样品处理、提高重复性、减少交叉污染机会等优点，一些系统还能将样品加入到反应混合液中等后处理的功能。这些优点需要与自动化系统的成本进行权衡，许多自动化仪器都是大规格的，而且批量的大小不可更改。这些系统的核酸提取方法各有不同，包括总核酸、仅DNA和仅RNA的方案。实验室采用自动提取系统需要考虑这些系统是否可接受各种类型和体积的标本、洗脱体积是否可变，能否应用针对特异和(或)通用的目标核酸提取方法、样品的处理量等。目前可用的自动化系统包括完全自动化的高通量系统，如MagNA Pure和cobasAmpliPrep systems(Roche)，*m*2000sp(Abbott)和QIAsymphony(Qiagen)，以及为小数量标本设计的BioRobot EZ1(Qiagen)和NucliSENS(bioMérieux)。

有各种各样的商品化仪器可用于实时PCR检测，这些设备的速度、每次运行的样品的容量、反应体积、光学和支持不同荧光探针类型等方面均有不同。分析所需的时间在很大程度上取决于热循环所需的时间，热循环的速度取决于仪器能否随时间变化而快速地进行温度的变化。例如，有些仪器能以20℃/s变化的温度，允许多达32个样品在短至30 min内进行分析。容量可能影响热循环速度，虽然一个大容量的仪器比容量较小的仪器具有较长的循环时间，但是在特定时间段内，大容量仪器比小容量仪器可能可以分析更多的样品。

各系统的反应混合物的体积也总是有所不同。如果样品中含有极少量的目标核酸，可能要首选更大反应体积的分析仪器。

实时PCR仪器利用各种光学方法检测荧光，大多数仪器使用钨灯作为激发光源，用滤光片选择激发光和发射光的波长。发光二极管或激光作为激发装置与发射波长检测组合也在使用。新的实时PCR仪器在一个反应中允许多达6种不同的荧光染料同时使用。Prism系列的测序系统(Applied Biosystems)、LightCycler(Roche)、SmartCycler(Cepheid，Sunnyvale，CA)和Rotor-Gene(Qiagen)等仪器设计最初用于研究，而现在广泛使用临床分子诊断实验室。cobas TaqMan分析仪(Roche)和*m*2000rt系统(Abbott)是第一个专门为临床实验室设计的实时PCR仪器[153]。

许多厂商生产的仪器，将扩增及检测和自动核酸提取结合起来，构建了一台全自动的高通量的核酸分析仪。Tigris and Panther系统(Hologic)、cobasAmpliPrepTaqMan、cabas 4800和cobas 6800/8800系统(Roche)，*m*2000系统(Abbott)和Viper and BD MAX系统(BD Diagnostics)是完全自动化和集成设计的范例，可进行样品处理、核酸扩增和产物检测。

GeneXpert系统(Cepheid)的出现象征着其他自动化设备的终结，该仪器将一个样本加到一次性流体盒中，完全自动化和集成了样品制备、扩增和实时检测。该仪器具有随机存取设计，适合于按需分子诊断测试。其他的一些简单、样品进结果出、按需设计的系统包括FilmArray(BioFire)和AmpliVue(Quidel)等。Alere i和Roche cobasLiat系统是比较领先的简单的从标本到结果的例子，真正的用于非实验室专业人员使用的POCT项目，获得CLIA豁免[154]。

在选择和实施新的分子微生物学仪器平台之前，需要考虑一些问题[155]。这些问题包括供应商提供的测试项目、技术支持、价格和试剂盒组合等方面的支持。还应评估仪器平台功能的工作流程、可靠性、灵活性和方便性。仪器说明书中关于环境条件(如温度、湿度和气流)和功能要求均需在最后的选择之前仔细审查。

八、当前应用

分子方法为临床微生物学实验室影响患者医疗方面创造了新的机会，具体体现在初步诊断、疾病预后和监测治疗反应等领域。随着时间的推移，这些方法已变得更加自动化，测试成本更加低廉，并且文献表明临床应用这些技术提升了各种感染性疾病的诊断和管理。因而，当前许多临床微生物学实验室常规进行分子检测，未来，这些检

测的临床应用将继续扩大。各种感染性疾病诊断用的床旁或即时的核酸扩增检测试剂盒已经上市或准备上市。这些即时检验可能会扩大分子微生物学进入资源匮乏的地区，并对 HIV、HCV、性传播疾病和结核分枝杆菌感染控制的全球公共卫生计划起到潜在地创新驱动作用。

(一)初步诊断

随着分子生物学方法的发展，临床微生物学实验室不再单纯依靠传统的培养方法检测临床标本中的病原体。以培养为基础的方法一直是感染性疾病诊断的金标准，而对于某些疾病，以核酸为基础的测试已经取代了培养成了金标准。例如，HCV 感染、肠道病毒性脑膜炎、百日咳、HSV 脑炎、呼吸道病毒感染、沙眼衣原体和淋病奈瑟菌引起的生殖道感染等都是将核酸为基础的测试作为感染性疾病诊断新的金标准。对于结核病等其他疾病，核酸扩增试验是培养方法有用的辅助措施，可以提供更快的初始诊断和及时的公共卫生干预措施。这种技术的应用极大地改变了传统方法缓慢的、不敏感的、昂贵的或不可用的状况。这些技术特别适合脆弱或苛养微生物，它们可能在运输过程死亡或在培养过程中由其他污染的生物覆盖。以淋病奈瑟菌为例，在培养阴性的情况下，核酸仍可以检测出。使用不合适的采集工具、不恰当的运输条件，或运输延误可减少病菌的存活但核酸仍能检测出来。对所有可能的应用方法进行评述或提供一个各种病原体检测方法的概要已超出本章的范围。读者可直接参考另一针对此信息的优秀资源[156]。

在常规的实践中，由于需要分离微生物进行抗菌药物敏感性试验，因此，替代细菌病原体培养的机会有限。当病原体的敏感性是可预测的，或耐药基因是明确的和可以简单检测的，如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌，培养实际上已经被核酸检测所替换。在本手册第 11 版中，大多数临床微生物学实验室已经用核酸扩增方法取代了抗原检测诊断艰难梭菌相关性疾病，这是由于核酸扩增试验有与毒素培养类似的性能特点而分析时间更短[157]。

在临床上，分子方法检测病毒的影响力最大，它往往比传统方法更快、更敏感、更经济。肠道病毒性脑膜炎、HSV 脑炎、呼吸道病毒感染及免疫功能低下患者 CMV 感染的诊断是基于核酸测试与临床相关和具有成本效益的应用例子。与细菌学相比，在病毒学方面，由于昂贵的培养方法和并不需常规进行抗病毒药物敏感性试验，因此，分子技术有更多替代常规方法的机会。在某些情况下，抗病毒药物敏感性试验是必需的，如更昔洛韦耐药的巨细胞病毒的鉴定，分子生物学方法(如测序)是快速鉴定基因突变的一个选择。CDC 推出的新的 HIV 诊断测试流程进一步扩大了分子测试的诊断作用[158]。在这个新流程中，采用 Aptima HIV-1 RNA 定性检测方法(Hologic Gen-Probe;FDA 批准用于 HIV 诊断)或用 HIV-1 病毒载量检测方法检测 HIV-1RNA，有助于快速诊断第四代筛选(抗原与抗体的结合分析)试剂结果不一致时和需要增加抗体测试以鉴别免疫检测假阳性结果时的急性 HIV-1 感染。同样，HCV RNA 检测取代了重组免疫印迹检测作为 HCV 感染的补充试验[159]。随着 CDC 采用修订的测试建议，对所有出生于 1945－1965 年的人，无论有无危险因素都进行一次性 HCV 测试的建议，临床实验室将进行更多的 HCV RNA 测试[160]。

分子检测诊断感染性疾病的主要限制之一是：临床需要同时进行与呼吸道感染、脓毒症、胃肠炎和脑膜脑炎等临床综合征相关的多个病原体的鉴定[161]。本章前面介绍的多参数或多重分析的分子微生物学技术促进了这些综合征的处理。在写本章之时，美国 FDA 批准了用于检测呼吸道、胃肠道、中枢神经系统和血流感染等的高度多重的检测板。对基于多参数平台的症候群分子微生物学检测技术的开发和配备，也许将成为未来不断发展的趋势。

也许分子方法的最大作用是发现先前未知的或不能培养的病原体。在过去的 20 年中，一系列感染性疾病的病原体通过使用分子的方法从临床材料中首次直接鉴定出。1989 年，CDC 和 Chiron Corporation 公司应用分子克隆技术发现了 HCV，它曾经被称为非甲非乙型肝炎的主要病原[162]。HCV 基因组的克隆和分析发现了病毒抗原，是输血筛选和 HCV 感染的诊断用的特异血清学试验的基础。到目前为止，所有尝试进行持续离体 HCV 增殖的研究均未成功。因此，RT-PCR 方法用于受 HCV 感染的个体检测、定量和基因分型。

惠普尔养障体(*Tropherymawhipplei*)是惠

普尔病的病原体，这是另一个用分子方法首次鉴定微生物的案例[163]。它是在针对细菌16S rRNA基因保守序列引物的广范围PCR中发现的。PCR产物的序列分析与已知的16S rRNA基因序列比较的结果用来鉴别微生物并建立其与疾病的关系。这种方法提供了一个新的发现不明病原体的范例，为具有独特特征的疾病找到感染性病因。

对于识别新出现的病原体，分子方法是非常强大的工具，在本书第17章中详细介绍。采用通用引物的RT-PCR和病毒DNA微阵列快速鉴定了严重急性呼吸综合征的病原是一种冠状病毒[164-165]。在公认暴发的几个月内，研究者鉴定了病毒并对其进行了测序，开发出分子检测方法，而这些方法在诊断感染和确定感染的流行病学方面发挥了重要作用。

同样，高通量的鸟枪测序为发现微生物病原提供了新的重要机会。此方法从3岁肺炎患儿鼻咽分泌物中确定了一种新的多瘤病毒(polyomavirus)——WU病毒[166]。研究者使用专门设计的实时PCR检测并证明这种病毒存在于0.7%～3.0%的急性呼吸道感染的患者中，且大多数患者合并其他呼吸病毒感染[167]。这种方法也用于检测胃肠炎儿童粪便中已知和未知的病毒，和旧世界沙粒病毒(Old World arenavirus)，该病毒曾引起由单一供体移植3个器官给受者而致死亡的事件[168]。

(二)通过核酸测序鉴定细菌和真菌

细菌的16S rRNA基因序列分析已经扩展了我们对细菌系统发育关系的认识，也是新的细菌鉴定的标准。rRNA包含几个功能不同的区域，有些区域具有高度保守性，有些高度变异[169]。16S rRNA基因的序列是一个稳定的遗传标记，可将微生物鉴定至属或种的水平。可以迅速测定16S基因序列，并获得不依赖表型特征的客观结果。正如前面所讨论的，它也可以用来描述先前未识别的物种。同样的，rRNA基因的核心大亚基可用于真菌的鉴定[170]。这种基因普遍存在于所有的真菌中，并且包含足够的变异，能将大多数真菌准确地鉴定到种的水平。

微生物鉴定的DNA测序方法涉及核酸提取、PCR扩增目标序列、测序和计算机软件辅助搜索一个合适的序列数据库。这种方法鉴定微生物的局限性主要包括自动核酸测序成本高，缺乏相应的分析软件和有限的数据库。

Applied Biosystems(FosterCity，CA)开发了对细菌和真菌的核糖体基因测序试剂盒。用MicroSeq分析软件将未知的细菌序列与>1000型别菌株的全部或部分的16S rRNA序列比较[171]。软件分析提供了未知的细菌和20个最密切相关的细菌之间的碱基差异百分比，其比对工具可以显示相关序列之间的差异，系统发育树工具核实未知细菌属于数据库中20个最接近细菌中的确切的群。MicroSeq真菌微生物测序鉴定系统类似于细菌鉴定系统，但其目标是rRNA的D2大亚基[172-173]。随着自动化和分析软件的不断改进，以及成本降低，核酸测序为基础的方法在微生物鉴定得到了更广泛的应用。

最近，焦磷酸测序或合成测序已用于鉴定感染性疾病的病原体。由于高质量的测序长度限制为50～100 bp，因此，非常适合单核苷酸多态性分析，早已用于微生物分类学。这种方法需要确定一个包含不同微生物群各自独特序列的可变区域。焦磷酸测序技术已成功应用于临床上重要的分枝杆菌和诺卡菌的分类、酵母和丝状真菌的鉴定[174-175]。CLSI已出版了一本指南，重点对DNA序列分析用于微生物鉴定的解释和结果报告作了规定[176]。

基于MALDI-TOF MS系统的蛋白质组学鉴定细菌和真菌方法已在临床微生物学实验室广泛应用(第5章)。MALDI-TOF MS系统可以快速、可靠和经济地鉴定出常见和非常见微生物，因此，现较少使用DNA测序来鉴定复杂微生物。二代测序可能取代MALDI-TOF MS系统，因为它不仅能识别病原体，而且还具有分析耐药机制、流行病学重要基因多态性和毒力性状的潜力。除非取得某些变革性的技术发展，否则二代测序在可预见的未来还难以挑战简单、快速和经济的MALDI-TOF MS技术在该领域的地位。

基于DNA的微生物组学研究通常分为两类[177]。目标产物的研究集中在1个或多个标记基因，并用这些标记来揭示微生物群的组成和多样性。其他的用鸟枪宏基因组方法，随机获得基因组序列。16S rRNA基因是目标基因扩增研究中最常用的基因，这是因为此基因具有大量的参考序列和细菌分类的数据库可用。各种测序技

术，包括大规模并行测序，已经用于分类学分析。本书第16章讨论更为完整的用于研究人类微生物组学的实验与分析工具。

(三)疾病预后

分子技术为实验室创造了在预测疾病进展中提供重要信息的机会。最佳范例也许是HIV-1病毒载量作为艾滋病感染者疾病进展和死亡的预测。这一预测值作为1996年一项多中心艾滋病队列研究的一部分被首次证明[178]。研究人员发现艾滋病进展与死亡的危险性与入组时血浆中病毒载量的高低直接相关。血浆中的病毒载量较$CD4^+$淋巴细胞的数量能更好地预测疾病的进展。随后的研究证实，基线病毒载量严重影响疾病的进展。

某些病毒的分子生物学分型可能对预后判断有价值。呼吸道合胞病毒的亚型分型可提供住院婴儿感染严重程度的信息，A组病毒感染预后较差[179]。HPV引起女性子宫颈的不典型增生、上皮内瘤变和子宫颈癌，其中HPV 16型和18型与进展成肿瘤的高风险相关，6型和11型与低进展风险相关[180]。高危型HPV DNA分子检测在临床的应用，帮助建立了对意义不明的非典型鳞状细胞子宫颈细胞学诊断的管理程序。基于高危型HPV DNA检测结果，可对具有上述情况的女性进行相关的阴道镜检查[181]。FDA批准HPV DNA检测用于30岁或以上的女性子宫颈癌细胞学筛查的辅助手段[182]。最近，子宫颈癌预防和早期检测的筛查指南强调了对于30～65岁女性即使子宫颈细胞学无异常时HPV检测的重要性[183]。

CMV载量的检测有助于确定器官移植受者启动抢先治疗的时机，此检测可以区别无症状携带和活动性感染者。CMV DNA的水平可以预测活动性CMV的发展，高病毒载量将增加症状性疾病的风险[184-185]。定量检测也可鉴别如EBV和HHV-6等其他疱疹病毒的感染。

(四)治疗的持续时间和反应

在许多情况下，分子方法检测单一或某类抗菌药物耐药菌的相关基因优于表型或以生长为基础的方法。耐甲氧西林葡萄球菌、耐万古霉素肠球菌、耐碳青霉烯类的肠杆菌科细菌和耐利福平的结核分枝杆菌的分子检测，已经作为一个样板，用于以生长为基础的方法的补充[186-187]。然而，鉴于目前的微生物耐药性的分子遗传学知识的状态和技术的限制，在今后的一段时间内，常规药物敏感性试验中基因型方法尚不能在提供信息量和成本方面与表型方法相竞争。

分子技术在预测和监测患者对抗病毒治疗的反应中正发挥越来越大的作用。实验室通过测定特异性耐药突变、确定病毒载量和基因分型，可预测治疗的反应。虽然基因型是预测治疗反应的主要因素，但是病毒载量和基因型可独立预测聚乙二醇干扰素联合利巴韦林治疗慢性HCV感染患者治疗反应[188-189]。那些治疗前病毒载量高的(≥200万拷贝/ml或600 000 U/ml)或基因1型感染的患者较基因2和3型感染的患者持续应答率低[188]。基因型也用来确定治疗的持续时间，基因1型感染需要的疗程比基因2或3型感染更长[189-190]]。最近的研究确定了基于病毒反应程度所需要的治疗疗程。在开始治疗12周后，患者的病毒载量下降未达到≥2-$\log_{10}$或大幅度下降的，很可能对聚乙二醇干扰素和利巴韦林没有反应。而且，一个快速病毒学应答的患者(在开始治疗后4周HCV RNA水平<50 U/ml)可能需要较短的治疗疗程，条件是他们具有一个低的基线HCV RNA水平(≤400 000 U/ml)和最轻的肝纤维化[189]。

2011年FDA批准的第一个治疗慢性丙型肝炎病毒基因1型感染有靶向作用的抗病毒药物，改变了治疗和监测治疗反应的模式[191]。波普瑞韦(boceprevir)和替拉瑞韦(telaprevir)2种药物是丝氨酸蛋白酶抑制药，可用于与聚乙二醇干扰素和利巴韦林的联合治疗。目前包括至少5个不同的药物正在研发或临床试验阶段[192]。目前，一些抗病毒药物获批用于不含干扰素的丙型肝炎病毒感染联合治疗。治疗开始前，需要进行HCV病毒载量测定，以确诊患者为慢性感染并评估治疗过程中的临床反应。许多研究分析了通过将干预前/预处理时HCV RNA检测结果进行分层/分区以观察抗病毒制剂的治疗反应，但确切的临界值(cutoff)因药物配方而异[191]。目前的指南建议在治疗4周后重复进行HCV RNA检测；然而如果在第4周可检测到HCV RNA，除非其水平比基线值[193]高出10倍，否则没有数据支持可以停止

治疗；在完成治疗后至少12周没有检测到HCV RNA被用作DAA药物治愈HCV感染的替代终点。

目前，如果肝硬化患者且正在考虑使用艾尔巴韦(elbasvir)或达卡他韦(daclatasvir)治疗，则建议对1a基因型感染患者进行NS5A耐药相关变异体的预处理评估[191]。如果识别出NS5A耐药相关变异体造成艾尔巴韦的敏感性降低5倍以上，那么当前建议是将艾尔巴韦-格佐普韦(grazoprevir)治疗的持续时间延长至16周，另加利巴韦林联合治疗。任何其他与耐药相关的变异试验尚未得到临床研究的支持。

HIV-1 RNA定量测试已作为指导临床医生启动、监测和更换抗病毒疗法的标准。FDA已批准几种市售的HIV-1病毒载量检测试剂，它们用于临床实践的指南已经发表[194]。病毒载量检测方法也用于监测在慢性乙肝病毒[195]感染的治疗反应和预测肾移植受者BK病毒相关性肾病的发生风险[196]。在器官移植受者中，抗病毒治疗后CMV病毒载量持续数周的情况与耐药性的发展有关[197]。

九、实验室实践

核酸扩增试验具有无与伦比的分析敏感性，也正因如此，该技术极易发生交叉污染。在临床实验室，常规应用这些技术遇到了独特的挑战。应特别关注标本的处理、工作流程、质量保证和检测结果解释等领域。更多的信息见*CLSI MM03-R*，*Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases*；*DraftReport*[198]、*MM6-A*，*Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases*；*Approved Guideline* 第2版[199]、*MM13-ACollection*，*Transport*，*Preparation*，*and Storage of Specimens and Samples for Molecular Methods*；*Approved Guideline*[200]和*MM-19A*，*Establishing Molecular Testing in Clinical Laboratory Environments*；*Approved Guideline*[201]文件。

(一)标本采集、运输和处理

恰当的收集、运输和处理临床标本是确保可靠的分子检测结果的基础，在整个过程中必须保持核酸的完整性。标本采集的重要问题是必须考虑与疾病状态相关的采集时间和适当的类型。其他需要考虑的因素包括使用适当的抗凝剂、运输和储存温度、标本处理的时间。作为实例，HIV-1病毒载量检测的标本采集、运输和处理的合适条件得到了很好的描述，这些因素的重要性被充分认识。在HIV-1病毒载量检测时，为了尽量减少RNA的降解，血浆需要在收集后的6 h内与细胞分离。血浆一旦分离，可以在4℃储存数天，长期储存建议在−70℃[202]。大多数类型的标本在处理之前最好存放在−70℃～−20℃。

在标本采集方面，分子的方法比传统培养具有多个优点。保持核酸的完整性比保持生物的活性更容易。沙眼衣原体和淋病奈瑟菌的分子检测是一个例证，在室温或冷藏温度下DNA在干的子宫颈拭子中可稳定1周，而培养方法需要维持生物体生存的条件。在治疗开始后，即使该生物体不能再进行培养，核酸仍然会在标本中存在，仍允许检测病原体[203-204]。由于分子检测的敏感性增加，可以用较小量的标本进行检测，或使用微创的方法收集标本。

标本处理的主要目的是从生物体中释放核酸、保持核酸的完整性、消除样品的感染性、去除抑制物质并在某些情况下浓缩标本。需要优化这些过程以使对标本的操作最少化。复杂的标本处理方法非常耗时，并可能导致目标核酸丢失或标本之间相互污染。从核酸分离步骤到扩增反应，必须注意避免携带过多的抑制物质，如苯酚或酒精。

有几种不同的方法可用于核酸的提取，这些方法的使用主要根据需要纯化RNA和(或)DNA。在决定核酸提取方法时要考虑检测的病原体类型。一些病原体如病毒，非常容易裂解，而分枝杆菌、革兰阳性菌和真菌很难裂解。对于微生物，可能需要酶消化、剧烈的裂解条件或机械破碎来破坏其细胞壁。

DNA提取经常使用表面活性剂溶解细胞壁或细胞膜、蛋白水解酶(如蛋白酶K)消化蛋白质、EDTA螯合核酸酶活性所需要的二价阳离子[205-206]。裂解物可直接用于扩增检测，或需要额外的步骤纯化核酸。这些步骤包括去除蛋白和残留的有机溶剂并浓缩标本。为成功使用粗裂解物，样品中必须有相对高浓度的DNA和最少的扩增抑制剂。如果这些条件不满足，应使用额外的纯化步骤。

另一个常用的方法是用促溶剂异硫氰酸胍和表面活性剂裂解细胞或生物体而分离核酸[207]。短暂的孵育后,用异丙醇沉淀核酸。异硫氰酸胍能使蛋白变性,是一个强有力的核糖核酸酶抑制剂,是非常有用的 RNA 分离工具,也可以用于 DNA 纯化。"Boom"的提取方法也是基于异硫氰酸胍裂解和使核酸酶失活的特性,用酸性结合的硅或玻璃颗粒纯化核酸[208]。

当大体积的临床样本中存在少量检测目标微生物时,需要把目标微生物浓缩到一个可检测的水平。可将特定的核酸结合到固体支撑物上,使目标核酸与其结合,从而将其与原来的样品分离。这些技术称为目标捕获。目标捕获技术通过连接在固定磁珠上的捕获探针和目标核酸结合,从而将目标核酸固定在磁珠上。磁珠分离设备将磁珠吸附在样品管的一侧,洗脱和移除其余的样品,以此达到浓集目标核酸的目的,也去除了样品中干扰扩增的物质。

过去几年,各厂家开发的商品化试剂均使用这些基本方法之一或改良方法。他们大多采用容易、快速、重复性好的离心柱技术纯化各种临床标本中的核酸。近年来,随着磁性二氧化硅粒子的引入,不同程度的自动化仪器的发展进一步简化了核酸的提取和纯化。这些试剂往往很昂贵,但增加的费用可由减少的劳动力所抵消。实验室正在越来越多地使用自动化核酸提取系统,因为它们所需的实际操作时间较少,可减少样本之间交叉污染的风险并使结果更一致。现在有许多自动化系统可供临床实验室使用,应该彻底评估它们的性能,因为不是所有的核酸分离方法都具有相同的效率和纯度。核酸的质量对分子测试的性能有重要的影响。

组织样本在核酸提取前需要破碎,将组织切成小块或用机械将组织打成匀浆,再用上述的提取方法完成核酸提取。保存的组织标本需要用溶剂除去石蜡,在提取前将其切成细段。

去除扩增的抑制剂是核酸提取过程一个关键步骤。简单的煮沸法提取核酸用于相对细胞数少的标本,如脑脊液(cerebrospinal fluid,CSF)。煮沸法虽然快速简单,但 CSF 中的扩增抑制剂没有灭活[209]。用硅胶基质提取方法可以将抑制率降低到<1%。同样,尿和子宫颈拭子标本的粗裂解物通常用于沙眼衣原体和淋病奈瑟菌的检测,已报道 1%~5%尿标本含扩增抑制剂而子宫颈拭子高达 20%[210],常见的抑制物质包括血红蛋白、晶体、β-人绒毛膜促性腺激素和硝酸盐。血液样本通常用于各种病毒的检测和(或)定量,包括 HIV-1、HCV 和 CMV。以 HIV-1 病毒载量检测为例,不同抗凝剂的效果得到了很好的研究。当用 EDTA 采集标本时 HIV-1 病毒 RNA 最稳定,并证明肝素能抑制扩增,应该避免使用[211]。极少量(1%)全血可以抑制 Taq DNA 多聚酶[212]。其他的化合物,如痰和子宫颈标本中存在的糖蛋白的成分酸性多糖、粪便中的胆盐,也可以抑制多聚酶[213]。人源 DNA,当在样本(如组织或血液)中大量存在时,也可能干扰低浓度的病原体核酸的检测。随着我们认识到的扩增抑制剂越来越多,且简单、可靠、半自动和全自动核酸提取方法可及性增加,粗裂解物用于检测变得更难以接受。无论采用哪种核酸提取法,实验室都应监测不同的标本类型和核酸提取方法的抑制率(见后述"质量控制和保证")。

(二)污染控制

分子检测可发生以下几种类型的污染,即核酸提取步骤中标本的交叉污染、阳性对照物污染标本和扩增产物的携带污染。扩增产物的污染可以发生在 DNA 或 RNA 的目标扩增和探针扩增法中,此污染不会发生在信号扩增方法中,因为这种方法无核酸分子的合成。标本处理过程中发生的交叉污染或处理阳性对照物发生的污染可能发生在所有的扩增方法中。随着实时扩增检测方法的广泛应用,控制由扩增产物引起污染的方法已经取得重大进步。扩增后不打开反应管,就能将扩增产物引起污染的风险降至最小。许多使用实时方法的实验室持续使用各种好的规范以控制污染,但重点是将标本间的交叉污染最小化,而非扩增产物的污染最小化。污染最小化的良好实验室规范详细说明,请参见 CLSI 文件 MM03-R,*Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases;Draft Report*[198]。

临床微生物学家一直关注标本处理过程中标本之间微生物污染的最小化。目前的分子方法已经可以检测到几个分子,大大提高了分子方法的关注度。在处理常规培养的标本中,先前未发现的低水平的污染可以导致分子检测中的假阳性结

果。预防靶DNA或RNA的污染,最好小心处理标本、避免飞溅、每个时间只开放一个样品管、将管子短暂离心后再打开、用螺旋盖管而不是扣盖管以减少气溶胶、"漂白"(译者注:彻底清除污染的核酸)工作台面;以及使用带有滤芯的吸头。这些方法中,有些步骤对标本量大的实验室可能很困难,在这些实验室自动提取系统就非常有用。实验室必须小心操作这些系统,以确保在自动化过程中没有交叉污染。通常在携带样品盘中交替排列阴性和高滴度的阳性标本,然后监测阴性标本受污染的情况。这些实验应该根据不同临床标本中微生物的浓度来设计,例如,脑膜炎患者CSF中HSV的浓度比肾病患者尿中BK病毒的浓度低很多。

防止临床标本或阳性对照物中的DNA对实验室污染非常重要,因为一旦发生就可能很难消除污染靶DNA,因此,在连续扩增中要使用最低浓度的阳性对照。用于控制扩增产物携带污染的酶法和光化学失活法对防止靶DNA污染是无效的。

在多种细菌中发现的尿嘧啶-N-糖苷酶(uracil-N-glycosylase,UNG)能使扩增产物失活,UNG是一种DNA修复酶。在PCR过程中,dUTP替换dTTP而掺入到新合成的DNA的产物中。这使起始模板DNA和扩增产物间产生了区别,只有新合成的PCR产物含有脱氧尿苷。如果含有UTP的扩增产物存在污染,加入UNG到反应混合液中会导致脱氧尿苷残基的裂解,从而破坏污染的DNA[214]。UNG的使用使得对扩增反应造成污染所需携带的DNA的量提高了几个数量级[215]。当使用UNG时,退火温度应保持55℃以上以灭活剩余的UNG,避免新合成的产物降解。基于同样原因,扩增后的反应物应保持在72℃[216]。UNG在94℃可灭活,但94℃延迟失活也会影响多聚酶的活性。由于UNG无法从RNA分子中去除尿嘧啶,因此,UNG不能有效控制RNA扩增中的污染,如TMA和NASBA。

当使用UTP和UNG时,应重新优化PCR反应条件,可能需要增加镁离子的浓度。UTP取代TTP可能会降低扩增的效率,这可以通过在扩增反应混合物中加入dUTP和dTTP的混合物来克服。UNG灭活效率取决于扩增产物的大小及其G+C含量。当扩增产物<100 bp时,灭活可能无效,这是因为UNG最大的灭活效率要求DNA分子至少为150 bp[217]。

临床实验室需要特别关注以前的核酸扩增产物污染,涉及实验室工作台面、设备、试剂、实验室人员的服装。因为这些常规测试的产物可以随着时间的推移而累积,可以在不经意间转移到后续试验中,造成假阳性结果。为了最大限度地减少潜在的污染和假阳性结果,用目标扩增方法进行分子检测时,实验室布局应符合传统的设计模式:物理分隔扩增前区域(试剂的制备和标本的处理)、扩增检测区和扩增后(如DNA测序)区域,并各自保持单独的通风系统。除了使用专用的房间、生物安全柜和用于标本测定过程中各种密闭的盒子外,通常实验室采用专门的单向流程,即标本运输、材料用品补充和人员由扩增前区域向扩增后的区域单向流动进行每个实验阶段。扩增前和扩增后区域的物理分隔和单向流程对需要扩增后打开反应管分析,或将扩增产物转移到另一个容器及设备(例如,测序仪或液珠芯片仪)进行分析的实验室特别重要。而对于使用实时扩增方法,特别是那些全部采用全自动化系统进行核酸提取、扩增和检测的实验室来说,扩增前和扩增后的严格分隔就显得不太重要了。

(三)质量控制和保证

"验证"(verification)和"确认"(validation)是经常交换使用的术语,但重要的是,要记住它们是不同的过程[218]。验证是确定某个分析方法的性能的过程;相关的参数包括敏感性、特异性、阳性和阴性预测值和准确度;分析方法应用于患者检测前应完成验证过程。确认是证明分析方法如预期那样履行,达到预期的结果或预期用途的过程。

某检测方法的分析性能验证将提供该检测方法的性能特征信息,包括检测限、线性和测量范围(定量检测)、准确度、精密度和特异性,而临床验证需要确定检测方法的临床效能。在一个检测方法应用临床之前,其分析性能特点应该很好地加以理解,在确定临床用途时,要考虑该检测方法的任何限制。例如,一个定性的HSV DNA测试可能具有足够的敏感性检测出HSV脑炎的病例,但其敏感性却不足以检测HSV脑膜炎病例中低水平的DNA。

当分子检测较金标准方法更敏感时,确定分

子检测的临床应用价值具有难度。这种情况可见于在商品化分析系统检测生殖道标本中的沙眼衣原体。分子检测已证明比金标准的培养法更敏感。一个不敏感的金标准可以使分子检测显示假的低特异性。在此情况下，可使用扩大的金标准。对于沙眼衣原体，扩大的金标准包括直接荧光抗体检测和(或)另一分子方法[203-204,219]。在确定分子方法检测罕见病原体的临床应用中具有更多的挑战。这些检测方法通常是实验室开发的试验(laboratory-developed tests，LDT)，并且在很多医疗中心，这样的病例罕见，因此进行临床验证很困难。此外，这些罕见病原菌的标准品和质控品常不易获得。目前，几家公司可以提供常见的分子检测质控品，如沙眼衣原体、淋病奈瑟菌、HIV-1、HCV和CMV。CDC的基因检测参考材料协调方案(genetic testing reference materials coordination program)提供了一个完整的分子微生物学试验的参考材料和国际标准的列表，可以访问 http://www.cdc.gov/clia/Resources/GetRM/。在建立病毒载量检测的临床应用时，能否获得基于共识标准(如HIV-1、HCV、CMV、EBV和BKV的WHO国际标准)制备的校准品非常重要。这些校准品的缺乏使得LDTs的标准化非常困难。特别对于CMV和EBV来说尤其成问题，由于潜伏感染和无症状激活会导致低水平病毒的复制，凸显了建立初始或减少免疫抑制剂治疗的临床临界值的需要。由于缺乏国际标准，各LDTs[220]测定的病毒载量值之间一致性较差，所以需要由各个实验室测定临床上重要的临界值来预测疾病的发展。现有的标准应该提高各LDTs测定的病毒载量值之间的一致性，这将有利于临床建立相关的临界值。

阳性质控品应设计成确保测试能够始终如一地测定检测方法的检测限或接近检测限的目标核酸浓度。阳性质控品应为可重复扩增的最低浓度。如果阳性质控品高出检测的临界值很多，则可能无法检测到扩增效率小幅降低。此外，使用大量的目标基因将增加实验室污染的问题。对于定量检测，必须有2个水平的阳性质控，低水平的阳性质控品应接近定量方法的下限而高的阳性质控品接近检测上限。对于定量上限为10^7或10^8拷贝/ml实时检测方法，由于可能无法获得足够量的质控品，所以经常使用在10^5个拷贝/ml的范围内的样本。根据所使用的材料不同，阳性质控品可以是纯化的核酸、裂解的或完整的微生物。提取过程中的质控是检测所用的核酸提取或纯化方法从微生物中成功释放核酸的能力，其质控品应该是完整的微生物，如果浓度合适也可以作为阳性质控品使用。

监测标本中存在的抑制剂非常重要，特别是对于血液或痰等复杂的标本。有以下几种方法可用于控制抑制物。

一种方法是将临床标本两等分，一份直接扩增，而第二份加入等量的阳性对照DNA作为标记。对于目标分析物是阴性的标本，其测试结果为：直接扩增标本必须阴性，而标记标本必须阳性。如果存在扩增抑制剂，则标记标本将是阴性。作为标记的阳性质控品的浓度应接近检测方法的检出限，以确保检测出低水平的扩增抑制物。

另一种用于检测扩增抑制物的方法是在核酸提取前，在临床标本中加入一个内质控物。正如“定量方法”中所讨论，内质控物可以设计成与目标分子具有相同的引物结合位点，但需进行一定方式的修改，以便根据产物的大小或序列能将检测目标和质控品分开检测；也可以设计成不与检测目标分子共享相同的引物结合位点，在这种情况下，需要一组单独的引物进行扩增。内质控是监测扩增抑制的有效方法，但由于检测物之间的竞争分析可使敏感性降低。可以将人的管家基因如珠蛋白基因的扩增作为内质控，但该基因不应在检测的目标分子中大量存在，或已发生目标分子的扩增抑制而没有证据显示管家基因扩增抑制。当使用一个新的样本提取方法或样本类型时，应在检测中包括抑制物质控。成本效益法认为一旦抑制率确定为<1%，就可以不用这些质控。然而，不用内质控将会限制人们识别出分析前抑制因素的能力，如标本采集管中含有肝素而非EDTA时，肝素引起的抑制作用。

在某些情况下，有可能需要确定标本中是否含有足够的核酸，例如，当使用石蜡包埋组织或评估的质量时。此时，扩增管家基因可以用于确定标本中是否含有人类DNA。如未从标本扩增出人类DNA，则需要关注标本的质量是否合适。

应在所有的检测中包括阴性质控，并将其与临床标本同样处理。阴性质控应经历所有的检测步骤，包括核酸提取过程。由于污染往往是低水

平和零星发生的，因此，在阴性质控中没有出现检测目标的扩增并不能确保检测过程中没有发生污染。使用多个阴性质控可能会提供更多的没有污染的证据，但这种方法可能成本过高。理想情况下，阴性质控品应为相关的分析物阴性的临床标本，但这些类型质控物可能难以获得，所以通常用水或缓冲液替代。

目前，CAP是唯一的由医疗保险和医疗补助服务中心批准通过的对感染性疾病的分子检测能力进行计划审核的机构。CAP提供了许多在临床实验室常规测试的常见病原体的能力验证项目。分子诊断的质量控制计划是由欧洲临床病毒学学会和欧洲临床微生物学和感染病学会（Glasgow，Scotland，United Kingdom）共同主办的，该计划提供了各种病原体的能力测试。当无正式的外部能力验证计划时，实验室可与其他实验室分割标本进行验证，新方法和实验室已经建立的方法分割标本进行验证，或通过临床诊断确认试验结果。当实验室间交换标本进行能力验证时，2个实验室使用同样的方法非常重要，特别是对于定量方法，不同的检测方法测定的病毒载量值可能会有相当大的差异。

（四）报告和结果解释

分子检测的结果解释需要认识这些技术基本的优点和局限性。解释分子检测结果会遇到一些在传统微生物检测中不常见的独特的问题（如培养和血清学），以及假阳性结果的识别、无活性微生物和活性微生物区别、核酸检测与所患疾病之间的相关性等问题。

对于一个阳性检测结果的解释，需要考虑检测的特异性和污染。大多数分子检测的特异性与扩增和检测过程中使用的引物和探针有关；如果它们与其他的病原体有交叉反应，那么就可能出现假阳性结果。例如，用于检测结核分枝杆菌的引物，一定不能与正常的口腔微生物群或其他呼吸道常见病原体如肺炎链球菌发生交叉反应。尽管引物的特异性问题不太常见，但还是时有发生。鼻病毒和肠道病毒有密切的关系，但找到一个能测定所有鼻病毒和肠道病毒而没有交叉反应的保守基因是很困难的。鼻病毒不引起脑膜炎，因此，在检测脑脊液标本中的肠道病毒时不会有问题；然而一旦在口咽部发现肠道病毒，解释呼吸道标本中鼻病毒的检测结果就变得复杂。引物特异性的问题在市售的淋病奈瑟菌PCR检测法中也有报道，其使用的引物与口咽部的非致病奈瑟菌属有交叉反应[221]。假阳性结果也可能是在标本处理过程污染或携带了以前的扩增产物污染所致。

阴性结果的解释需要考虑检测方法的敏感性、标本质量、核酸提取效能和扩增效率。这些因素中的任何问题都会导致错误的结果，因此，只要可行，就必须在检测时对每一个参数采取控制措施。假阴性结果的另一个来源是序列变异，它可以阻止引物或探针的结合。为了最大限度地减少这个问题，在方法设计之前应该彻底地搜索已知序列，并在投入临床使用后需间断地重新审视现有的数据库。标本类型不合适（如咽拭子和鼻咽分泌物检测呼吸道病原体）或在疾病过程中收集的时间不恰当均会导致假阴性结果。

分子检测病原体的核酸，不能确定该核酸的病原体是活的或死亡的。在适当治疗开始后的相当长的一段时间内，仍可以检测到病原体核酸。例如，沙眼衣原体的DNA可以在疗程结束3周后的患者尿中发现[203]。脑炎患者脑脊液HSV DNA的检测也有类似的结果报道。在阿昔洛韦治疗开始后，DNA可以持续存在2周或更长时间[222]。由于治疗开始后病原体核酸的持久性，定性分子检测方法不应该用来监测治疗的反应。HCV RNA RT-PCR用于治疗反应的监测是一个值得注意的例外。

病原体核酸检测不能确定该微生物就是导致疾病的原因。微生物可能是正常菌群的一部分，或是某个特殊部位的定植菌，或是感染的病原体。当使用比培养更敏感的分子技术时，区分定植和感染会更困难。常规培养方法可能无法发现非常低浓度的微生物，但使用分子生物学技术可检测到。综合测试板的广泛应用大大提升了实验室在常规测定中不被关注的既往感染和复合感染的病原体的检测能力，但随之带来的是对这些结果解释的一系列特有的挑战。

从正常无菌部位的标本如脑脊液或血液中区别感染和定植很容易，但并不能确保微生物是一个真实的病原体。这种区别对终身潜伏感染的疱疹病毒而言是一个问题。区分这两种状态的一个重要例子是用分子方法监测移植受者的CMV病。最初的研究使用了非常敏感的定量PCR检

测[223-224]，在从未发展为有症状的患者的血液中检测到 CMV DNA。定量分子检测对疾病活动性风险的分层是有用的，病毒载量越高，活动性 CMV 疾病的风险越高[184-185]。类似的数据出现在肺炎链球菌感染，早期的研究表明，呼吸道标本的定性试验不能从呼吸道无症状的定植菌中区别感染的肺炎链球菌。区分定植和感染的定量检测的临床应用正在研究之中[225]。

定性分子检测的报告通常很简单，结果往往是检测到或未检测到 DNA。可能报告的多个关键参数是检测限、与样本类型相关的抑制率、目的基因和所用的扩增方法等数据。定量检测结果的报告更复杂，需要考虑的参数包括测量范围、单位和精密度。定量分析的结果可以表示为规定体积内拷贝数、重量(纳克或皮克)或国际单位的目标核酸，如每毫升血浆或血液、每克组织或白细胞数。病毒载量值用科学计数法或以 10 为底对数的转换数据，计为整数。大多数对目标的扩增分析是以指数方式进行，因此，理论上应该报告对数变换的结果，这更能反映以指数方式复制的微生物载量的生物学相关变化。结果用 $\log_{10}$ 转换值报告时，可减少医生对病毒载量值不明显的变化产生过度解读。当患者和医生不熟悉 $\log_{10}$ 变换结果时，实验室可以选择报告整数和对数变换的数字。对于定量测试，由于检测精密度的关系，有意义的病毒载量值的报告数量应该是有限的。整数应该取十分位数或百分位数(734 拷贝/ml 记为 730 拷贝/ml；52 321 拷贝/ml 记为 52 300 拷贝/ml)，$\log_{10}$ 转换值应限制在 2 位小数。

定量检测的结果报告需要考虑测定方法的精密度。对于目前 HIV-1 病毒载量测定，批内和生物变异约 $0.5\times\log_{10}$[202]。因此，病毒载量的变化必须超过为 $0.5\times\log_{10}$(3 倍)才能代表病毒复制存在有意义的生物学变化。对于 HCV，批内变异为$(0.1\sim0.2)\times\log_{10}$ 拷贝/ml，而生物变异为 $0.75\times\log_{10}$ 拷贝/ml[226]，因此，具有重要的生物学变化意义的病毒载量值接近 $1\times\log_{10}$ 拷贝/ml。定量检测有一个明确的线性或测量范围，低于定量方法测定下限的值应报告低于测定方法线性范围的下限，而不是报告阴性。超过定量方法测定上限的值应报告为大于定量方法测定线性范围的上限。对高于测定下限但低于定量下限的结果可能会报告为“检测到，但低于线性范围的下限”。例如，如果一个 HIV-1 病毒载量检测定量下限为 40 拷贝/ml，标本检测的结果为 25 拷贝/ml，此时可报告为“检出 HIV-1 病毒，<40 拷贝/ml”。定量检测的报告中说明扩增方法和样品类型是特别重要的，不同检测类型的检测结果并不总是具有可比性。

(五)监管和报销问题

医学对新的分子微生物学检验的需求已超过诊断行业提交给 FDA 批准以填补这些需求的试剂盒的能力。FDA 目前核准或批准的以核酸为基础的感染性疾病测试的名录见 http://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/ucm330711.htm。

值得注意的是，有 2 个已成为移植受体测定标准的 EB 病毒和 BKV 载量试验没有列入名录。许多实验室已经开发了检测方法，以填补这些未满足的需求。这些 LDTs 必须根据医疗保险和医疗补助服务中心联邦法规(Code of FederalRegulations，CFR)42 章第 493 条指定的对实验室要求的最终规则进行适当的验证和确认[227]。这种测试如果能确定是医疗标准的一部分或提供临床获益的证明，则有资格获得医疗保险和其他纳税人的补偿。

LDTs 经常利用不同制造商的试剂进行组合，其中一些是 ASRs。ASRs 是化学物质，用于诊断试验中检测标本中的另一个特定的物质，例如，从具有此标签的厂家购买的抗体或核酸序列。ASRs 的价值是用于保证 LDTs 的试剂质量。ASRs 不包括使用说明或分析性能信息和临床适应证。FDA 要求 ASRs 用于 LDTs 时需要在报告中标注声明，它的内容如下：“这个测试结果和性能特性由[××名称]实验室开发测定，没有获得美国 FDA 核准或批准”。本免责声明不用于无 ASRs 的 LDTs，或 FDA 批准产品的超说明书使用。

将 ASRs 用于 LDTs 的实验室可能要在结果报告中包括澄清声明。这些声明可指出，这些测试无须 FDA 批准，并且是用于临床目的。附加信息可能包括实验室已通过 1988 年临床实验室改进修正案关于执行高复杂度测试的认可，并根据修订案的要求，实验室建立并验证了检测项目的准确性和精密度。

美国FDA目前引用执法自由裁量权承担管理LDTs的权限，已经表明将越来越多地监督这些检测。在2014年10月，美国FDA发布了题为“实验室开发项目监管原则”的指南草案（http://www.regulations.gov/contentStreamer?documentId=FDA-2011-D-0360-0002&attachmentNumber=1&disposition=attachment&contentType=pdf)。这表明对LDTs项目的监管有重大转变。然而，各方反馈的意见使管理机构重新修改在2017年前完成指南的计划。

美国FDA发布了一项指南草案，澄清了体外诊断产品用于RUO和仅仅用于调查（investigational use only，IUO）的产品的法规要求。此外，它强调的是，具有这样标签的产品不应该用于临床诊断和患者的管理（http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm253307.htm）。RUO和IUO的试剂、仪器和检测系统作为LTDs的组成部分已使用多年，限制他们的使用会中断临床实验室的检测，对患者医疗将产生负面影响。CAP和其他专业机构认为，一旦RUO和IUO试剂用于LDTs，FDA应该采用执法自由裁量权政策并尽快予以监督。

分子微生物学试验的正确现行程序术语（correct current procedural terminology）编码是保险和纳税人补偿的基础。1998年，许多使用直接探针、扩增探针和定量扩增探针的检测分析的特定代码写入此编码手册的微生物学部分，该列表的可用代码在继续扩大[228]。针对特定分析的代码引入简化了编码过程，在许多情况下，增加了分子微生物学检测的报销，但在相当多的地区，这些代码的报销率不同。

（六）证书

给分子诊断实验室配备拥有合适的基础知识和技能训练人员，仍然是一个挑战。直至最近，分子诊断学还不是医学技术项目核心课程的一部分。然而，情况正在改变，目前医疗技术专家和技术人员从美国生物分析学家协会、实验室人员的国家认可机构和美国临床病理学会获得这一领域的证书。2009年7月，国家认可机构和美国临床病理学会融合了他们的认可活动。实验室主任可以通过美国生物分析学家协会（医生和临床实验室的科学家）、美国临床化学委员会（医生和临床实验室科学家）和美国病理学和医学遗传学委员会（仅限医生）共同获得分子诊断证书。

十、未来方向

核酸检测将继续成为引领实验室医学发展的一大领域。这种技术在诊断微生物学中的应用数量将继续增加，随着这些技术变得越发简单、更易获得，它们也越来越多地纳入到常规临床微生物学实验室。然而，在报销额下降和成本意识增强的时代，现在比以往任何时候都更需要的临床和卫生经济学数据，以证明使用这种昂贵技术的合理性。

现在已经很好建立了分子检测的临床应用体系，美国FDA核准或批准的检测和临床需求之间的差距正在改善。然而，FDA正待提高LDTs的监管、限制RUO和IUO试剂和检测系统的使用，这也限制了实验室开发检测项目满足临床需要的能力，这些体外诊断检测产品未能满足需求。虽然最近几年有相当大的进展，但还有一些重要的需求未能满足，包括用于测定方法的验证和确认的国际标准品、可溯源的和可替代的校准品。广泛使用这些材料将提高不同方法的结果的一致性，推进分子检测在临床应用。另一个需求是持续发展有效的能力验证计划，这将有助于确保实验室的分子测试结果是可靠的、可重复的。

在很大程度上，分子微生物学未来的发展依赖于自动化。许多可用的检测都是劳动密集型的，且大部分的劳动专门用于烦琐的样本处理。目前，已有数个完全自动化的分子诊断系统服务于高中等容量的实验室，但大多数遭受着测试项目有限的痛苦。为了拓展分子检测的使用，需要研发那些简单、经济、完全自动化、测试范围广、可随机操作的检测平台，特别是对于低到中等容量的实验室。在发达国家和发展中国家，感染性疾病POCT核酸检测已开始进入临床实践，对于需要短的周转时间且不能集中设置在一个实验室时的情况尤其重要[229]。

应用多重核酸检测板筛查高危患者可能的病原体是分子微生物学的目标。目前出现了数种这样的检测，但迄今为止它们仍为某些系统的技术复杂性所限制。分子检测技术应成为简单的、多

参数的技术，才能与培养方法和其他常规方法一样用于感染综合征的诊断。

宏基因组学的研究提供了人类微生物组学的新视野，这些微生物群落(communities of microorganisms)的改变已与一些疾病状态有关。随着大规模并行核酸测序成本的持续下降和必需的生物信息学工具的可用性增加，人们对人类微生物组学的认识很可能将导致微生物组学相关的新型诊断和临床干预策略的产生。

参考文献请扫二维码查阅

第 8 章 感染性疾病诊断的免疫分析

ELITZA S. THEEL

（胡志东 译；孙立颖、王辉 审校）

虽然分子技术和质谱分析极大地改变了诊断领域，但在多个临床场景中，血清学评价不仅可行，而且可以用于诊断。由于可检测的体液免疫应答的固有的延迟性，免疫分析常作为确证试验。因此，血清学试验并不是诊断的唯一依据。血清学评价通常是回顾性的，但对于某些微生物，包括那些不容易培养的[如伯氏疏螺旋体（*Borrelia burgdorferi*）、梅毒螺旋体（*Treponema pallidum*）]或采样前因使用抗微生物药物可能延迟或抑制微生物生长时，血清学试验则具有优势。在这些情况下，检测针对感染因子的抗体或病源释放的抗原通常可以提供更快速的诊断。

免疫分析定义为待测物有作为抗原的能力来检测待测物（如抗体或抗原）的存在或数量[1]。虽然血清或血浆是评估的主要样本来源，但许多免疫分析已被验证可以用于其他类型的标本包括支气管肺泡灌洗液、尿和脑脊液（cerebrospinal fluid，CSF）。免疫分析可适用于跨学科实验室的分析物检测，它比其他的诊断方法更具成本效益，如核酸扩增检测。

本章将总结用于检测体液免疫应答或各种感染因子释放的抗原的常用血清学试验方法。下面的讨论将详述它们在感染性疾病诊断中的应用，包括选择方法学的优点和局限性。其中包括与临床试验相关的具体实例。有关更加深入的、以病原体特异性血清学试验为核心的内容，笔者将引导读者阅读本手册的指定章节。

一、免疫分析发展史

首个免疫分析方法诞生于 20 世纪 40 年代，此法源于各种琼脂凝胶上肉眼可见的抗原-抗体沉淀线，这种被称为免疫扩散（ID）的分析方法，由瑞典医生 Orjan Ouchterlony 发明，可以检测到毫克甚至微克的分析物（表 8-1）[2-3]。然而，免疫扩散法需要大量人工操作并且结果解释具有主观性。这些局限性，以及抗体或抗原纯化技术的同时改进和新检测系统的引入，引发了更为敏感和客观的免疫分析方法的发展[4-6,8]。

表 8-1 所选免疫分析方法的检测限[a]

方法学	报告的检测限范围
沉淀反应（如双免疫扩散或欧式试验）	20～200 μg/ml
补体结合试验	1～3 μg/ml
被动红细胞凝集试验	50～100 ng/ml
被动凝集法	0.5～5.0 ng/ml
RIA（放射免疫分析法）	0.5～2.0 ng/ml
EIA（酶免分析法）	0.5～1.6 ng/ml
CIA（化学发光免疫分析法）	0.3～1.0 ng/ml

注：[a] 数据来源于参考文献[7][78-79]

1959 年，临床化学领域迎来了免疫分析方法发展的首个重大进展。Solomon Berson 和 Rosalyn S. Yalow 发明了一种新型的放射性免疫分析方法（radioimmunoassay，RIA）来检测人类胰岛素抗体，他们因此获得了 1977 年的诺贝尔医学奖[9]。RIA 利用一种放射性同位素（如^{125}I、^{3}H、^{14}C）标记纯化的抗体，并使用闪烁计数器或相纸客观评价结果。RIA 显著提高了反应的敏感性，并极大地扩展了分析物的可报告范围（表 8-1）。RIA 也是后期酶免疫法的参照方法。单克隆抗体的发现和 1975 年 Kohler 和 Milstein 开发的抗体形成杂交瘤细胞，提高了 RIAs 结果的特异性，并进一步扩大了分析物的可报告范围[10]。在最敏感的免疫分析技术中，RIAs 给实验员带来了许多严峻挑战，包括处理放射性物质的生物安全风险。鉴于存在

这些顾虑，RIA 几乎完全被使用非放射性标记物的分析方法所替代，包括基于酶或化学发光的检测方法。

在过去的十年中，随着用于包被抗原或抗体的各种固相载体的发展和更新，检测标志物的提高，免疫分析方法得到了发展。最初的固相载体是聚丙烯测试管，随后绝大多数被微量滴定板所取代，包括液体处理和自动化免疫分析平台的实验室自动化已经扩展到免疫学分析领域，使技术人员人工参与减少。随着大型复杂的自动化系统的涌入，小型的固相载体如微盘、微球等载体的使用也随之增加。

可在一个试验中提供对多个抗体/抗原目标的多重分析能力。总体上，随着可用方法学的多样性及其应用范围的扩大，免疫分析技术有了显著的发展，现已成为应用最广泛的临床测定方法之一。

二、免疫学基本原理

为理解血清学免疫分析方法及其临床应用需要了解体液免疫的基本免疫学原理。抗体的产生是体液免疫系统的一个功能，更确切地说，是 B 淋巴细胞的一个功能[11-15]。这些细胞利用膜结合的免疫球蛋白(immunoglobulin，Ig)分子或抗体识别一系列的抗原，就微生物来说它是通常表达于病原体表面的抗原。抗原刺激体液免疫应答的能力是基于许多因素，免疫原性抗原的特点是具有高的：异质性、循环抗原的水平、分子量、结构稳定性和复杂性。因此，蛋白质和大分子多糖被认为具有高度免疫原性，脂质和较小的碳水化合物对体液免疫反应基本上是惰性的，除非结合到更复杂的成分。

基于不同免疫球蛋白的电泳迁移率不同，可分为五类(IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM)，而感染性疾病血清学主要检测 IgG 和 IgM 类抗体。IgM 类抗体约占总循环 Ig 池的 10%，而 IgG 占比达 75%[15]。然而 IgM 为一个单一亚类并可能有 10 个抗原结合位点，由于其分子量较大而主要局限于血液循环，但 IgG 有 4 个独特的亚类(IgG1-4)，每个亚类都能结合 2 个抗原，并且很容易从血管外扩散到组织和其他地方。

在首次暴露于一种新抗原后，不成熟的 B 淋巴细胞受刺激后分化为分泌可溶性抗体的浆细胞，或静止期的记忆 B 细胞。初次暴露于一种感染因子后，抗体反应可分为 4 个阶段：①初始延滞期(3～5 天)，在此期间 B 细胞克隆性扩增并向浆细胞分化，检测不到抗体；②对数增长期，抗体滴度呈对数增长；③平台期，抗体量保持稳定；④衰减期，这个阶段抗体被清除或分解。重要的是，实际反应时间和抗体滴度变化取决于感染源、抗原的免疫原性和个体的免疫状态。在初次暴露过程中，最初的抗体反应主要是 IgM 组成，在感染后 5～7 天可检测到，随后在暴露后 7～10 天产生 IgG 抗体。随着 IgM 抗体减少，IgG 浓度将会上升，在感染的 2～3 个月后，只有 IgG 类抗体可被检出。当重复暴露于同一感染因子时，静止期的记忆 B 细胞受到刺激后迅速转变为浆细胞，这被称为记忆反应。虽然与初次反应中产生抗体的 4 个阶段是相同的，但延滞期通常较短，而平台期较长。此外，虽然再次暴露也会产生一些 IgM，但 IgG 是主要的免疫球蛋白，抗体水平比初次感染明显升高(10 倍或更高)。在抗原暴露的数月后，IgG 水平趋向稳定。即使之后没有同种抗原暴露，也可终身检出该抗体。

抗原与抗体结合的部分称为“表位”，抗体-表位相互作用的强度为“亲和力(affinity)”，亲和力越高，抗体-表位结合越强。此外，重复暴露于同一种抗原会使抗体-表位的结合增强，这种现象称为“亲和力成熟”。抗原-抗体的结合强度还有赖于每种免疫球蛋白的抗原结合位点数量(即 IgG 有 2 个位点，IgM 有 10 个位点)，因此，复合体的总结合强度远大于单体之间的结合强度。这称之为“亲和力(avidity)”。和亲和力成熟类似，随着抗原暴露的越多，亲和力越强，亲和力指数测定可用来辅助判断感染发生的阶段(详见后述亲和力部分)。

尽管抗原-抗体反应具有很强的特异性，但是针对多种不同抗原包括来自不同微生物具有相似抗原决定簇，会产生一系列具有不同亲和力和亲和力的抗体谱。在检测针对密切相关的微生物产生的免疫球蛋白时，由于抗体的低特异性，而会出现交叉反应。尽管目前的分析方法在设计上有助于避免这些问题，但是实验室工作人员和临床医生仍然需要认知可能存在的交叉反应。

三、免疫分析的一般概念

(一)筛选试验与诊断试验

血清学试验可作为筛选工具或用于诊断目的。筛选试验旨在检测无症状个体的感染[例如,移植前检测巨细胞病毒(cytomegalovirus,CMV)抗体,而诊断试验用于确定有症状的患者是否存在感染,这些患者符合临床和暴露感染的标准(例如,HIV/AIDS患者合并脑膜炎时进行脑脊液隐球菌抗原检测)。理想的筛选试验应该同时具有高特异性和高敏感性,然而,这很难达到,具有高敏感性的试验作为筛选试验比较好。此外,对于一个有效的筛选试验,测试人群中该疾病的患病率应较高,而一个高敏感性且低特异性试验用于低患病率的人群时会导致假阳性结果增加,并可能增加潜在不必要的附加试验或治疗。

由于敏感性和特异性之间的相互关系,筛选试验本身不能单独用于诊断疾病,筛选试验阳性的样本应该通过另一种具有高特异性的试验进行评估,来确认结果。实施筛选试验应该优先考虑实验花费和对疾病早期检测的影响。总之,筛选试验应在高患病率人群中应用,应具有价格低廉、易操作的特点,或许最重要的是,疾病的早期检测应该对患者的预后有着重要的积极影响。

(二)血清学评价的标本来源

传统来说,血清和血浆被认为是通过血清学试验检测感染源抗体的主要标本来源。随着时间的推移,这一概念被扩大,现在泛指在患者各种类型的样本中检测抗原或抗体,包括CSF、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)、尿和其他体液。对这些特殊体液的血清学评价是有利的,因为阳性结果可以提供关于感染确切位置的额外信息。例如,检测到CSF中存在抗体,这可能是鞘内合成抗体(即在中枢神经系统中发生的抗体合成),也可能是由在创伤性腰椎穿刺过程中短暂地引入,或者由损伤或感染引起血脑屏障通透性增加所致。区分这些可能的情况可以通过使用Reiber公式测定病原体特异性抗体指数来实现[16-17]。这是将脑脊液中的抗体水平与血清水平总Ig和白蛋白标准化后进行比较,最终抗体指数>1.5通常表示鞘内抗体合成。虽然在临床微生物学中不常用,但计算抗伯氏疏螺旋体(*B. burgdorferi sensu lato*)抗体指数是评估神经莱姆病的主要部分[18]。

(三)免疫分析方法的分类

目前临床实验室使用多种血清学方法,从经典的凝集反应和沉淀反应到酶免疫分析法(enzyme immunoassays,EIAs)和多重流式免疫分析法。免疫分析分类的方法很多,最简单方法是根据信号产生或检测标签的存在与否来进行分类。最常用的无标记分析法是沉淀反应,也称为Ouchterlony分析或ID法,下面将对此进行更详细的描述。然而,大多数血清学试验依赖于标志物的存在,标志物可以是固体颗粒、放射性的、酶学的、化学发光或荧光性质的。免疫分析可分为均相分析或异相分析。均相分析在液相中自由进行,其特征是目标分析物与含标志物试剂结合后信号产生标志物发生改变,这样就不需要将结合物和游离成分进行分离。这些分析方法以其速度、易用性和自动化潜力而著称,在临床化学实验室中经常用来测定药物或激素水平。

相反,对于异相分析,目标分析物和标记试剂的相互作用不会改变信号产生标志物,因此,在反应完成后,这种免疫分析方法需要物理去除(如清洗步骤)用于检测目标分析物的存在或不存在的游离的、有标记的组分。因此,异相分析涉及一些免疫反应物附着的固相载体(如微量滴定板或聚丙烯酰胺珠)。上述分类法实用,且适用于一般的免疫分析,读者要注意的是,不是所有的免疫分析都严格适用于上述的分类方法。

(四)应用血清学试验检测保护性免疫

一般情况下,IgG类抗体的存在仅表明在过去某个时间暴露于某种特定的致病原,无论是感染还是通过接种疫苗。然而,检测到IgG并不一定意味着现有的抗体水平就能产生免疫并防止再次感染。在某一个体,血清中实际存在的病原特异性的抗体水平是由宿主决定的,它受免疫应答基因和人类组织相容性系统所控制[19]。由标准酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assays,ELISAs)确立了某些疫苗可预防的疾病保护性免疫的最低IgG水平,包括破伤风(tetanus)(≥0.1 U/ml)、白喉(diphtheria)(≥0.1 U/ml)和

B型流感嗜血杆菌(haemophilus influenzae type B)(≥0.15 μg/ml),并非所有疫苗可预防的疾病均建立了这些参数[20]。

(五)应用血清学试验判断近期感染和既往感染

单独的IgM或IgG血清学结果不能判定疾病感染的阶段(即近期感染和既往感染)。高滴度IgG可能易使人认为是近期感染,然而抗体水平高低很大程度上具有宿主特异性,在刺激免疫系统方面,某些抗原较其他抗原更为有效。此外,免疫系统对抗原的应答能力也受到一系列其他宿主因素的影响,如年龄、遗传倾向和合并症[11-12]。最终,单时间点的抗体检测仅仅提示机体对某一特定抗原的高水平应答,并确定机体此前曾暴露于该感染因子。然而,使用血清学方法,有很多方式可以区分近期感染和既往感染。

1. IgM类抗体 检测针对特定感染源的IgM抗体可能是判断近期感染最常用的方法。检测IgM类抗体对于潜伏期较长的病原体和与免疫介导性疾病相关的病原体是最理想的,因为这些感染的患者通常会出现症状,并在IgM类抗体增加时出现[21]。这些感染包括EB病毒相关单核细胞增多症、巨细胞病毒(*Cytomegalovirus*)、急性乙型肝炎、细小病毒b19(parvovirus-B19)和麻疹(measles)。但解释某些病原体感染的结果时要慎重,因为在急性期后还会存在IgM(即感染后数月至数年)。这种现象在多种微生物中出现,包括巨细胞病毒、肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)、甲型肝炎病毒(hepatitis A virus)、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)和伯氏疏螺旋体(*Borreliaburgdorferi*)[22-25]。此外,IgM假阳性可能是由于多种原因造成的,包括多克隆B细胞的激活、密切相关的病原体之间的交叉反应抗体、潜伏病毒的亚临床再激活、自身免疫性疾病等[21]。

相反地,IgM阴性不能立即排除近期感染。IgM类抗体的产生需要1~2周,因此,如果在疾病过程中采样过早,还需要复检第2份标本。

2. 抗体滴度的显著改变 确认是否为初次感染的第2种方法是检测急性期和恢复期的抗体滴度。这要求采集2份血清样本:第1份在感染源暴露后尽快采样,第2份样本在2~3周后采样。理想情况下,2个样本应该在同一检测条件下进行测试,以减少因不同检测对最终滴度的评估。如果在第1次和第2次样本采集之间存在血清转换(阴性转为阳性)或抗体滴度至少增加4倍,则可确认急性感染的证据。这种方法的缺点是要求回访、缺乏定量或半定量测定抗体滴度的方法,以及症状出现与抗体反应进展之间的延迟。基于以上注意事项,大部分感染性疾病急性期的初步诊断不应该依赖于血清学试验。传统的方法,如革兰染色和基于培养的检测,以及分子技术,如核酸扩增试验,是早期临床管理的首选诊断方法。

3. 亲和力检测 持续感染可以通过检测IgG类抗体的亲和力水平来确定[23,26-27]。一般来说,感染早期产生的IgG抗体亲和力低,随着感染源暴露时间的延长,亲和力逐渐增加。利用亲和力分析,联合评估IgG和IgM抗体,可以更清楚地显示疾病所处的感染阶段。亲和力检测应用标准的EIA法,但是样本是在加入或不加入高浓度的尿素(一种IgG分离剂)的情况下进行。在尿素的存在下,低亲和力抗体迅速与抗原相分离,并被随后的洗涤步骤所洗脱,而高亲和力抗体,尽管存在尿素,仍然与抗原相结合。通过比较经尿素处理和未处理的样品中IgG的水平,可以评估亲和力。IgG亲和力的检测对于疑似感染刚地弓形虫(*T. gondii*)或巨细胞病毒(CMV)的妊娠妇女的评估特别有意义,这2种病毒均与围产期前及围产期感染有关[23,26]。例如,在对弓形虫IgM-和IgG-类抗体均呈阳性的妊娠妇女中,IgM结果的意义对判断是否感染很重要——这是近期感染的还是既往感染遗留的IgM?在这种情况下,IgG亲和力检测有助于建立感染的时间框架。如果IgG亲和力高,可以推测感染至少发生在3~4个月之前。相反,如果IgG亲和力低,则怀疑刚地弓形虫急性感染,需要进一步评估。

尽管亲和力检测存在潜在价值,但仍需注意几点:首先,低亲和力不保证是近期感染,低亲和力抗体可能存在数月至数年,这依赖于感染源和机体免疫系统状态;其次,被FDA批准的亲和力检测还很少,并且不同的分离剂和试剂类型可能会导致亲和力检测结果不同。

(六)EIAs的量化

根据它们的设计,EIAs可以提供严格定性、半定量或定量的结果。虽然EIAs的发展超出了

本章的范围，但这 3 种类型将在本章详述。定性 EIAs 只是简单地指示样本中是否存在待测物，结果报告为阳性、阴性或可疑的。结果是通过比较患者孔与空白孔或阴性对照孔的信号强度来确定的。使用定性 EIAs 无法准确地评估待测物的含量。半定量分析除了给出一个定性结果外，还提供一个定量值，指示样品中待测物的相对含量。这些值在性质上与 IFAs 报告的效价结果相似。半定量 EIAs 的数值通常是通过一个已知的检测中待测物的水平来确定，将患者样本的信号强度与其进行比较，并确定分析物的相对水平。最后，定量 EIAs 显示样品中有多少待测物的具体数值。这通常是通过将样品的信号强度与标准曲线进行比较来确定。根据标准曲线的建立方式，可以用不同的单位（U/ml、ng/ml、pg/ml 等）报告结果，并进行定性解释。

四、特殊免疫分析

免疫分析方法被广泛应用于临床微生物学和感染病领域。接下来的部分将具体阐述常用的免疫学技术。表 8-1 列举了所选分析方法的相对敏感性和大致的检测水平。

（一）沉淀反应

沉淀曲线最适于描述可溶性抗原与抗体的相互作用（图 8-1）。当抗原与抗体具有相同的克分子浓度（即等价带）时，抗原抗体结合形成不溶的抗原-抗体结晶，用多种方法可以看到沉淀物[5,28]。

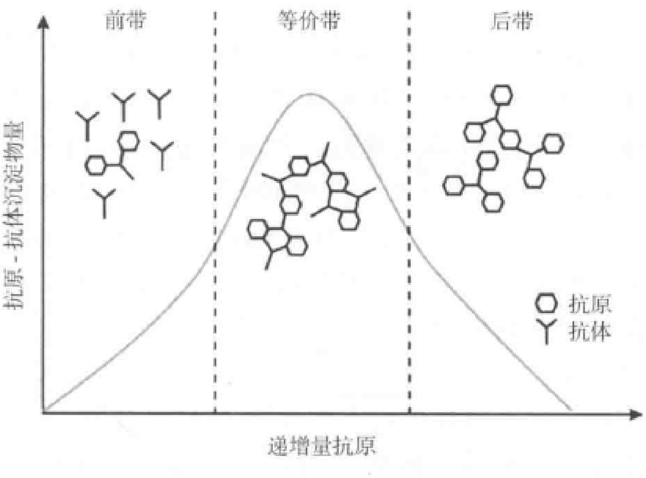


图 8-1　沉淀曲线显示等价带、前带现象和后带现象

当抗体过量（即前带）或抗原过量（即后带）时，在等价带的任何一侧形成稳定抗原-抗体晶格的效率都较低。被动免疫扩散是最简单的沉淀反应，它将免疫反应物（即抗体和抗原）同时放入惰性半固体基质（如琼脂糖凝胶）中观察沉淀带的形成。抗原和抗体被动扩散，其扩散速度依赖分子大小、室温或湿度、胶的黏度；这经常需要过夜孵育，但可以通过使用电流以减少周转时间（即免疫电泳）。

有一些技术是免疫扩散技术的改良。Oudin 免疫扩散法是单向试验，此法把抗体加在液体琼脂糖中，使其在试管中凝固。然后，将抗原加在胶的上面，抗原扩散直到形成沉淀线。径向免疫扩散法是 Oudin 免疫扩散法的改良方法，用于进行抗原的定量。抗体-琼脂糖混合物在培养皿中而不是试管中凝固，抗原加入中心孔并向外辐射性扩散。形成的沉淀带直径与已知抗原浓度的沉淀带直径相比较，计算最后抗原的含量。在保留免疫扩散方法的实验室中，双向免疫扩散或 Ouchterlony 分析最常见。在这个方法中，标本（通常是血清或脑脊液和特异病原体抗原）分别放入琼脂糖凝胶的不同孔中，两者都可以扩散。在等价带，产生可见的沉淀线（图 8-2）。

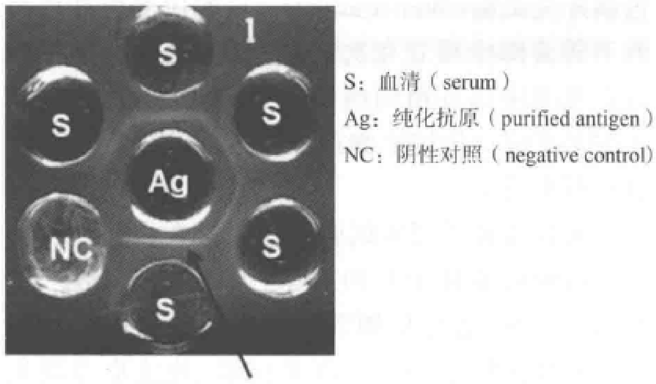


图 8-2　免疫扩散反应

总的来说，免疫沉淀反应具有极好的特异性（部分可接近 100%）、价格低廉且简单易行，适用于各种感染源。目前，由于结果的精确解释需要专业知识，这些方法主要在一些大医院、公共卫生和参考实验室应用。免疫扩散具有一些局限性，第一，它一般呈现出低敏感性，例如，一个阳性反应需要几微克的抗体。为克服这一局限性，将免疫扩散法与补体结合试验（complement fixation，

CF)一同进行(见下文)。第二,免疫扩散法需要大量纯化的抗原,而得到这些纯化抗原取决于病原体,通过商业渠道可能很难获得。第三,结果解释具有主观性,因为需要区分真正的沉淀线和非特异的沉淀线,周转时间长为 24～72 h。

(二)凝集反应

与沉淀反应相比,凝集反应利用的是不溶性抗原,而沉淀反应是基于可溶性的抗原和抗体之间的相互作用。颗粒性抗原与相应的抗体相互结合后形成肉眼可见的凝集,即一个阳性凝集反应[5,28-29]。由于 IgM 类抗体的五聚体结构,它在凝集反应中的效率是 IgG 类抗体的几百倍。因此,如果参与免疫反应的抗体主要是 IgG 类,那么可能需要一些能够结合到 IgG 抗体 Fc 段的化学增强剂或抗球蛋白试剂来加强沉淀反应[30]。根据抗原或抗体结合颗粒的类型可以将各种凝集反应进行分类。直接凝集反应的抗原涵盖自然界存在的微粒体,如整个细菌菌体和红细胞,也称为血凝试验。最常用的直接血凝试验是传染性单核细胞增多症检测试剂盒,此试验可以检测到由 EB 病毒(Epstein-Barr virus)引起的传染性单核细胞增多症产生的嗜异性抗体。其他经典的直接凝集试验包括外斐试验(Weil-Felix test),即用变形杆菌属的不同菌株检测立克次氏体抗体,这些变形杆菌与立克次体具有相同的特异性表位,导致抗体产生交叉反应。传统上细菌菌株的血清分型也采用直接凝集反应。

间接或被动凝集试验采用包被在由惰性材料组成的颗粒或珠子上的抗原(如乳胶、胶体金、明胶或硅酸盐)进行检测。间接凝集试验的例子包括对隐球菌抗原的乳胶凝集试验、快速血浆凝集试验和性病研究疾病实验室(venereal research disease laboratory,VDRL)进行的梅毒试验。由于间接凝集反应增加了阳性反应的可见度,故常优于直接凝集反应。最后一种称为反向被动凝集试验,即患者样本中的可溶性抗原可以通过与包被颗粒的抗体进行孵育后被检测出来。

病毒的血清学采用一种被称为血凝抑制试验的特殊血凝试验,来检测和量化抗病毒的抗体,包括流感病毒。这些病毒表达表面蛋白,称为血凝素(hemagglutinins),它可以通过与红细胞表面唾液酸受体结合而凝集红细胞。利用这一反应优势,血凝抑制试验可以通过将病毒和连续稀释的血清与红细胞一起孵育,用来检测流感病毒抗体。抗流感病毒抗体的存在可以抑制红细胞凝集,而呈现阳性反应。病毒抗体的滴度也可报告为抑制凝集反应的最终患者血清稀释度。

经典的凝集试验操作简单,可以在卡片、试管或微量滴定板内进行,成本低廉,因此,很多临床机构和公共卫生实验室都在继续应用。但是经典的凝集试验只能提供定性结果,通过样品的连续倍比稀释可以得到抗原或抗体的浓度。直接凝集试验的主要局限性是敏感性有限和有可能产生前带现象(图 8-1)。

前带效应是指由于患者标本中存在过量的抗体而不出现凝集现象,此现象可以通过连续倍比稀释标本予以有效解决[5,28,31]。

凝集试验的特异度有限,尤其是当类风湿因子(rheumatoid factor,RF)存在时[5,28,31-33]。RF 通常是一种 IgM 类自身抗体,它与人 IgG 的 Fc 部分结合,并能非特异性地交叉连接这些抗体,如报道的 IgG 包被的乳胶颗粒试验[5,34]。可以采取几种方法来避免或鉴别可能的假阳性反应。首先,如果怀疑假阳性,可以将待测样本的结果与包被正常 IgG 的对照颗粒进行对比,如果对照反应也是阳性,即表明为假阳性,还可以使用还原剂,如 2-巯基乙醇或链酶蛋白酶,对样本进行处理,以抑制 RF;也可以使用聚合 IgG 对样本进行预处理来去除 RF,但这样会导致抗原或特异性抗体的丢失,造成假阴性结果。

(三)补体结合

补体结合(complement fixation,CF)试验基于免疫复合物与经典补体途径中成分的相互作用[28]。这种经典技术是一个两步法过程,用来检测抗体和最终滴度。简单说,将患者血清加热(56℃,30 min)灭活自身补体,然后与特异病原的抗原进行孵育。在孵育过程中,如果样本中存在特异性抗体,那么将会形成抗原-抗体复合物。然后加入纯化的豚鼠补体,补体成分就会结合("固定")至溶液中所有的抗原-抗体复合物上,因此补体被灭活。再加入溶血素致敏的红细胞作为最终的指示系统。如果补体被抗原-抗体复合物所固定,红细胞会受保护不被裂解,离心后将沉淀在反应孔底部(即存在抗原特异性抗体的阳

性结果)。但是,如果没有形成抗原-抗体复合物,补体将保持活性并裂解红细胞,导致离心后没有细胞沉淀(即阴性结果)。重要的是,CF结果是根据观察到的溶血程度分级,而不是根据红细胞沉淀的存在或数量分级,这使得对结果的解释有一定的主观性。例如,存在0～30%的裂解被认为存在待测抗体,而35%或更多的裂解被认为无抗体存在。

CF试验相比凝集试验、沉淀试验和免疫扩散试验更加灵敏,价格相对低廉。但是,此法需要专业技术,需要实验室特异的质量控制和许多单独成分的滴定,特异性不如被动免疫扩散。这些试验反应时间长、所需试剂(如纯化抗原)不易获得。因此,很多这类试验已经转变为EIA为基础的形式。然而,在很多实验室仍然使用CF试验作为多种致病原检测的确认方法,包括粗球孢子菌(*C. immitis*)、波萨达斯球孢子菌(*C. posadasii*)及荚膜组织胞浆菌(*H. capsulatum*)。

(四)中和试验

另一种经典的血清学技术是中和试验。它可用来检测能够中和病毒感染性的抗体而不依赖于其他免疫细胞或复合物[28]。空斑减少中和试验是中和试验之一。该试验在技术上具有挑战性,需要用活病毒与连续稀释的患者样本共孵育1 h,在此期间,如果存在中和抗体,它们将与病毒结合并使病毒失活。然后将该混合物接种到包被有单层病毒致敏细胞的孔中,经过5～7天的孵育后,评估是否存在细胞病变或斑块。出现斑块表明存在活病毒,而中和抗体在患者样本中不存在,相反,出现斑块或细胞病变表明存在中和抗体。另外,活病毒的存在(或不存在)可以通过免疫测定方法检测细胞和(或)上清液中的病毒蛋白来确定。

中和试验通常被参考实验室和公共健康实验室用来确证EIAs或其他低特异性试验方法获得的可能为阳性病毒血清学结果。例如,空斑减少中和试验目前作为抗寨卡病毒(Zika virus)IgM血清学试验阳性样本的确证试验,因为它们比单独的EIAs具有更强的特异性[35]。作为黄病毒科(*Flaviviridae*)病毒的一员,寨卡病毒与登革病毒具有高度的同源性,导致这些病毒之间存在抗体交叉反应,如果不进行确证试验,则可能误诊[35]。中和试验还常用于评价病毒疫苗效果,尤其是在HIV疫苗的研究中,来验证候选疫苗能否有效诱导宿主产生抗体[36]。虽然该试验操作相对简单,但耗时长且需要进行活病毒培养,同时结果取决于读取的方法,结果解释具有主观性。再者,该试验在同实验室内及不同实验室之间都很难实现标准化。

(五)免疫荧光试验

免疫荧光试验(immunofluorescence assays, IFA)利用荧光标记的抗体(如用荧光素或藻红素染料标记)检测血清或其他临床标本中的抗原或抗体[5,28]。IFA主要分2类,即直接法和间接法(图8-3)。

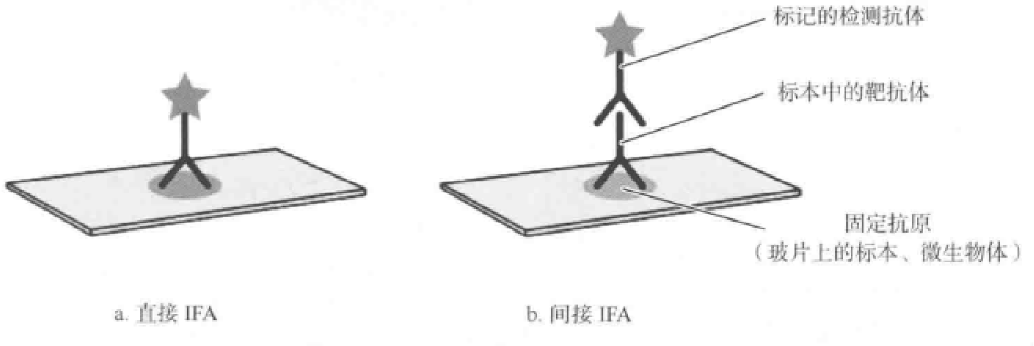


图8-3　直接和间接IFA

直接IFA利用荧光标记的单克隆抗体直接检测组织或体液中的目标待测物。例如,在鼻腔冲洗液标本中检测流感病毒,将样本滴至载玻片上,然后加上荧光标记的抗流感病毒抗体。再将玻片放在荧光显微镜下,使用荧光标志物适用的激发波长观察结果。如果样本中有流感病毒,标记抗体与之结合并发出荧光,会被实验人员观察到。相反,间接IFA包括2个步骤:将未标记的完整的微生物细

胞或感兴趣的菌体感染的细胞附着到显微镜载玻片上，然后，加入患者标本并进行孵育；如果标本中含有待测物就会形成抗原-抗体复合物，而未结合的标本会被洗去；然后，加入荧光标记的特异性人 IgM 或 IgG 二抗，观察载玻片有无荧光。

一般而言，IFA 是价格低廉且相对易于操作的试验，其被认为是半定量试验，允许使用连续稀释的患者样本来测定终点滴度。对于某些感染，包括 Q 热病(*Coxiella burnetii*)，这些效价可以用来判断疾病的严重程度或阶段，并监控疾病的进展或对治疗的反应。但 IFA 耗时长且需要购买昂贵的荧光显微镜设备。近几年，市场上可以买到进行 IFA 玻片处理的自动分析仪，并且已通过 FDA 性能认证[37-38]。另外，IFA 的操作需要训练有素且有经验的实验室人员，他们能够区别背景反应或者非特异性反应还是特异性的荧光，这取决于 IFA 和致病因子。IFA 结果解释具有主观性，而且实验室之内和实验室之间的结果也存在差异。与凝集反应一样，通常最终滴度的差异在±1 稀释度是可以接受的，因此，血清转化至少需要 4 倍的滴度差异才能被认为是有意义的变化。

(六)蛋白质印迹法和免疫印迹法

蛋白质印迹法(western blot，WB)是一种经典的固相分析方法，特异病原体的蛋白(无论是粗裂解物或纯化衍生物)通过变性凝胶电泳分离，转移(即转印)到硝酸纤维素膜上(图 8-4)。随后将滤膜与患者血清共同孵育，标记的抗人二抗可确定是否存在针对特异分离蛋白的抗体。显而易见，大多数临床实验室没有实施最初的蛋白质分离步骤，而购买预先印有蛋白质条带的硝酸纤维素膜进行测试。此外，许多平台已经开发出来，可以自动完成整个印迹程序(如洗涤、孵化和显影)，将技术人员所需的手工操作时间减少到最短。

与蛋白质印迹法不同，在免疫印迹法中，靶蛋白(纯化或重组)直接加到或“印刻”在硝酸纤维素膜上。由于消除了与裂解物等其他成分的非特异性结合产生的潜在交叉反应和背景干扰，因此，免疫印迹法提高了特异性，且结果解释更为清晰。无论采用哪种方法，都可以目视判读条带存在与否和谱型，尽管因条带响应度过高或过低可能造成主观的结果解释。

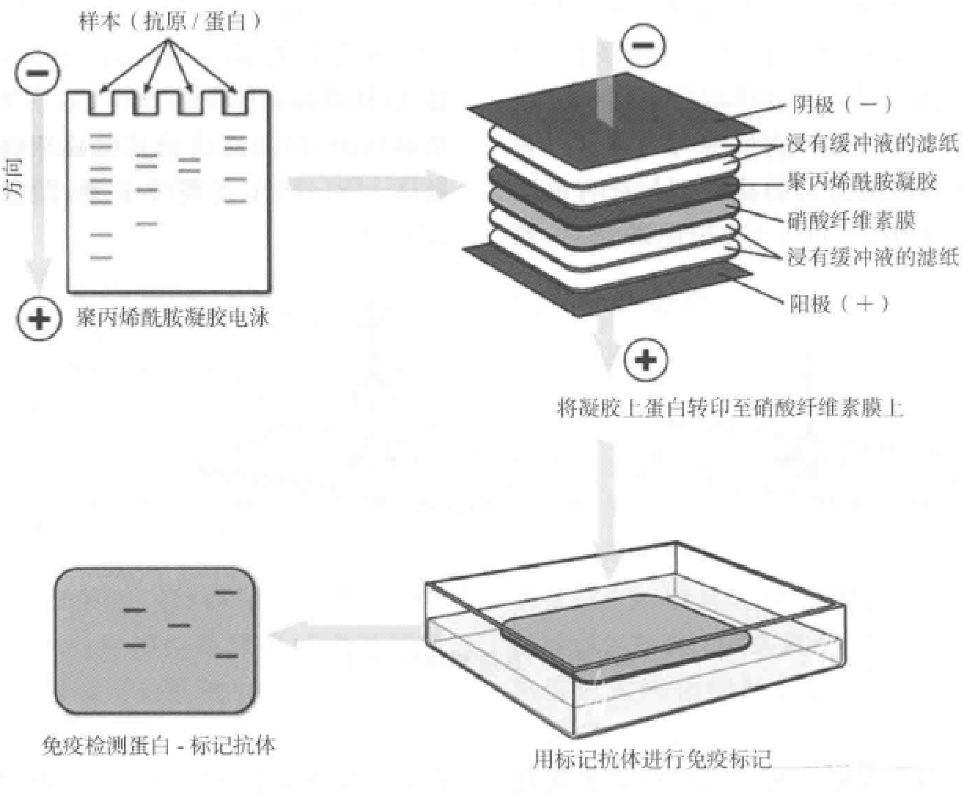


图 8-4　蛋白质印迹法过程

光学扫描仪器已取得了最新进展，这使印迹结果的解释更为客观。

蛋白质印迹法和免疫印迹法是初筛试验后最常采用的确认试验，它通过识别一个特异抗体带型来解释。比如，目前推荐这 2 个方法是检测莱姆病的病原体伯氏疏螺旋体抗体存在与否的第二级补充试验，初筛的试验样本中抗伯氏疏螺旋体 IgM/IgG EIA 呈阳性或可疑结果[39]。

(七)酶免疫分析

"酶免疫分析"是一个通用术语，可用于任何使用酶标记的免疫分析。相比较而言，虽然术语"ELISA"经常与"EIA"互换使用，但它更具体地指包被抗原或抗体于固相载体上，用第二酶标抗体进行检测的分析。这种方法也被称为"夹心法"分析。

EIA 使用的酶标志物可以是自发荧光、冷光，或是显色的物质。由于单一活化酶就可以催化大量底物，因此，每个反应检测到的信号是被放大的，试验敏感性可达到纳克级别(表 8-1)。在临床实验室，EIAs 的应用越发广泛，商品化制造商不断研发用来检测各种待测物的 EIA 法[4,5,8,31,40-41]。此外，EIA 比 IFA 和凝集反应更受青睐，因为它们通常提供更客观的结果，容易实现自动化，能够在实验室高通量进行检测并减少技术人员的手工操作时间。EIA 可设计为竞争性或非竞争性分析，定义如下[40]。

1. 竞争性酶免疫分析 竞争性试验通常利用包被在固相载体上(如微量滴定孔)未标记的抗待测抗原的特异性抗体，以测定血清抗原的水平。将患者样本与纯化的标记抗原共同加入反应孔，竞争吸附包被抗体(图 8-5)。作为阴性对照，单独使用酶标记的抗原和缓冲液进行相似的反应。在洗涤步骤后，加入酶的底物，通过产生的颜色反应评估结果。如果患者标本含有靶抗原，它将会和酶标抗原竞争包被在固相载体上的抗体，从而减弱或阻止颜色变化的发生。然后将这个反应与阴性对照(缓冲液加上酶标抗原)进行对比，测定特异颜色变化。对于竞争性试验，检测到的标记免疫反应物的含量与标本中存在的抗原量成反比。

与非竞争性试验相比，竞争性 EIA 虽然敏感性相对较低，但一般具有更高的特异性。竞争性分析是测量含量相对较低的待测物、低分子量或结合位点少的分析物的理想方法。

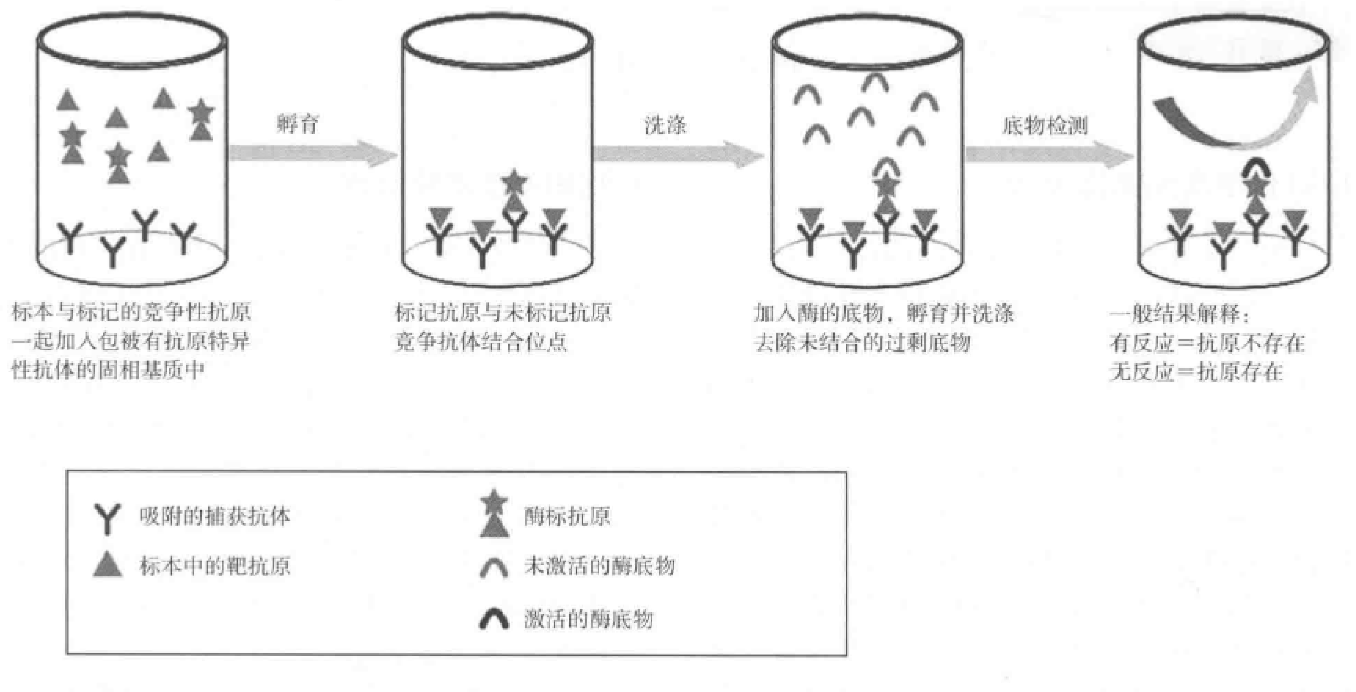


图 8-5 竞争性 EIA

2. 非竞争性酶免疫分析 与竞争性试验相比，非竞争性EIA的敏感性有所提高，已经成为临床微生物学领域的主要免疫学检测方法。多种固相载体包括微量滴定板、硝酸纤维素条和聚苯乙烯微球等均可以使用。样本中的特异性抗体与包被到反应孔上的纯化抗原结合，随后被酶标记的二抗检测出来（图8-6）。为了鉴定同型的特异性抗体（如IgG、IgM），同型特异性(isotype-specific)，酶标记的抗-Ig抗体可以被用作二抗，这也许是测量感染性病原体暴露或免疫状态的最常用方法。这类试验形式多样，捕获的待测物可以是免疫球蛋白、一种蛋白或任何具有至少2种表位的抗原。因为患者样本中的分析物被"夹"在固相成分和二级标记抗体之间，因此，这种形式通常被称作"捕获法"或"夹心法"试验。

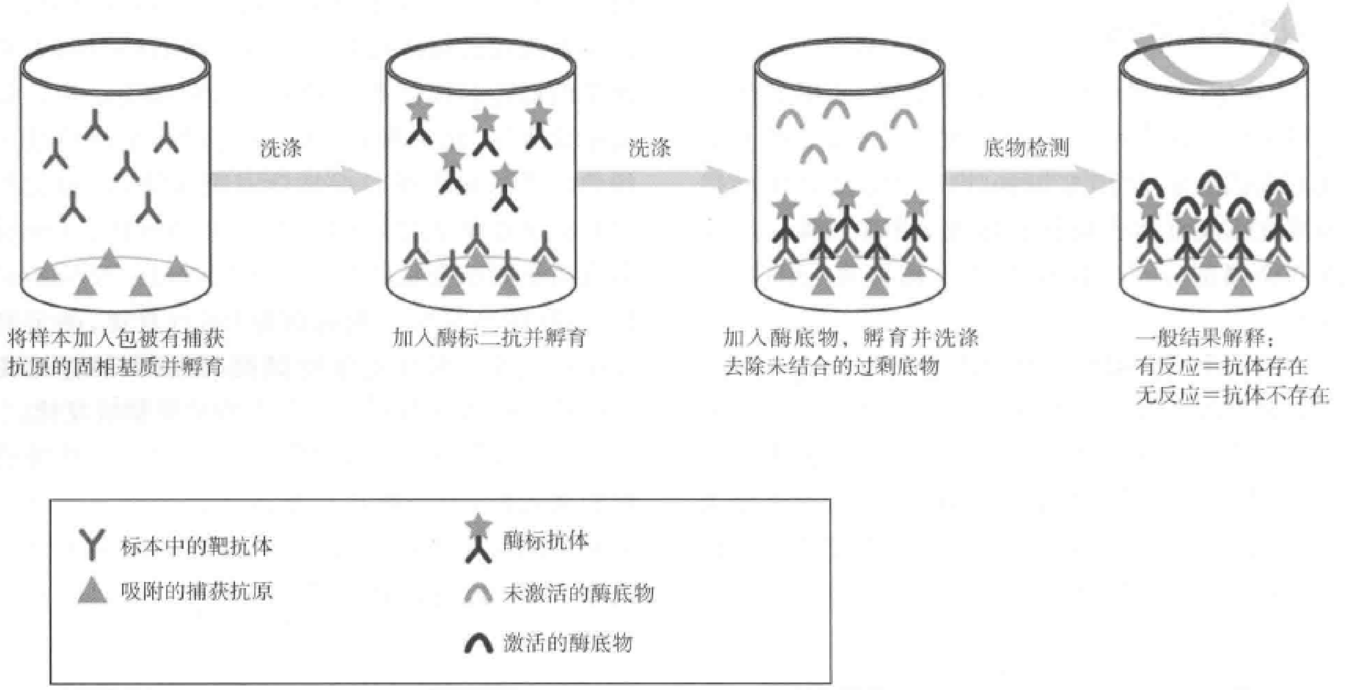


图8-6 非竞争性EIA

(八)化学发光免疫分析

化学发光免疫分析(chemiluminescent immunoassay,CIA)是一种形式多样的广泛应用的常用技术[5,31]。化学发光的定义是底物从激发态衰变到基态产生发射光。与荧光相比，化学发光衍生的能量来源于化学反应本身，通常是氧化反应。CIA在免疫分析中表现出最高的敏感性，检测限在10^{-21}～10^{-18} mol。化学发光标志物可以直接标记到抗原或抗体上，也可以用作酶标免疫反应物的底物。由于吖啶酯的敏感性高，最常用于CIA标记。通常经过加入氢氧化钠或过氧化氢后，这些化合物被氧化并产生光淬发，通过光度计检测或成像胶片捕获。CIA的优点包括标记稳定、敏感性高、成本低。该方法的局限性包括需要专门的仪器，如果在标本中存在淬灭剂可能会导致假阴性结果。

(九)EIA技术局限性

与其他实验室检测一样，经常会有一些因素影响试验性能。免疫分析，特别是聚焦EIA，也不例外，这些试验受到的不利影响要比其他常规临床化学和微生物学试验更多[4,8,33,41-45]。多种迹象使实验室意识到EIA可能得出不准确的结果，包括：①临床反馈检测结果与患者的临床表现不一致；②某个患者的结果在短时间变化巨大；③试验的阳性率和阴性率有明显变化；④试验失败增加。这些问题提示应对EIA相关潜在的技术问题进行调查，一些可能原因见下文所列。

1. 反应板的差异性 当我们使用固相微量滴定板进行夹心法EIAs的时候要注意几个问题[8,40-41]。第一，微量滴定板中孵育同一样本的相邻两孔在结果读数时可以存在差异。这种差异可能是由于每个反应孔在包被捕获抗原或抗体时缺

乏一致性。这种差异可以通过试验孔的变异系数(coefficient of variation,CV)体现,制造商应尽量将同一微量滴定板每孔的变异系数控制在3%～5%。第二,存在边缘效应,即同一微量滴定板的外周反应孔和内部反应孔在结果读数上的差异。虽然反应板的制造变异性可能是一个原因,但主要还是由于反应板外周孔和内部孔之间存在的温度差异,这不仅影响抗原-抗体反应,还影响酶-底物反应。有几种方法可以使边缘效应最小化,包括使用单排的微量滴定条,在检测期间密切监测温度及样本的曝光量。

2. 钩状效应 钩状效应是待测物的量在剂量反应曲线的顶端出现了不可预见的下降,导致待测物含量被明显低估。它相当于凝集反应的前带效应[4,8,33,41-45]。钩状效应尤其是在夹心法免疫测定含有极高水平待测物的患者标本中容易出现问题。在试验中,尽管当患者样本低倍稀释时可能得到一个低度至中度的高值,但是当标本进一步被稀释后,结果可能意外地继续升高或超出可报告范围。因此,如果实验室在进行单一的常规稀释标本时,他们应当注意钩状效应,以尽可能地追踪被临床医生考虑是假阴性结果的患者。

尽管对产生钩状效应的原因尚未给出确切的解释,许多学者认为,钩状效应的原因是抗原过量,过量的抗原与结合型及非结合型酶标抗体上的大多数抗原表位结合。那些游离的抗原-标记抗体复合物可以通过洗涤被去除,阻止了夹心物的形成和信号检测。此外,一些人认为钩状效应可能是由于综合因素造成,包括因抗体亲和力低而无法形成夹心复合物、洗涤不充分,或者是标记抗体水平欠佳。

有许多关于克服实验室钩状效应的建议。其中明显有效的方法就是对所有患者样本都用2个稀释度来筛选这种现象。如果标本在低倍稀释时不反应或反应很微弱,但在高倍稀释时有反应或超出范围,这警示实验人员反应中可能存在钩状效应。虽然这是一种有效的方法,但很少有实验室耗费时间、财力及人力对每个标本进行2次稀释。另一种减少钩状效应风险的方法是,在EIA所有手工或自动的步骤中确保洗涤充分,尤其是在加入和孵育每一种抗体后。此外,与试剂盒制造商密切沟通,一些厂商已经测定出可能出现钩状效应的水平,这样可以减少出现问题的频率。同样,在新试剂评价过程中,抗体水平过量的实验室检测标本很重要,因为不同试剂盒发生钩状效应的频率也不同。最后,与临床医生的直接交流非常重要。鼓励实验室直接与临床医生探讨EIA的局限性,尤其是可能出现假阴性的情况。

3. IgM测定 IgM类抗体的检测和定量带来独特的技术挑战[5,8,26,40]。与IgM类抗体检测相关的最常见问题是假阳性反应,通常假阳性是因为患者样本中存在RF。然而,假阴性结果也常发生,这是由于高浓度特异性IgG存在时,可以竞争性抑制IgM的结合。最初,设计检测IgM的EIAs是使用含有固定抗原和特异IgM二抗的标准间接固相EIA。然而,这些方法敏感性和特异性低。

为了避免这些问题,研究者开发IgM捕获法(图8-7)。在这个过程中,一个多克隆抗IgM抗体包被到固相载体上。加入患者样本孵育后,IgM被固相板捕获。再加入待检测的致病因子抗原,与包被板上特异性IgM结合。随后加入酶标记的第二抗体,与任意固相抗原结合。该方法避免了由于IgG水平升高而引起的竞争性抑制相关问题,这是因为患者样本中的IgG和RF在第一个清洗步骤后被移除。

4. 抗体干扰 患者血清中存在数种内源性抗体,这些抗体可能会干扰免疫分析结果[4,8,33,41-45]。抗体干扰类型多样,抗体可以通过与待测物结合(如抗病原体抗体),或与检测系统成分结合(如抗碱性磷酸酶),或与试剂抗体结合(如抗免疫球蛋白抗体)而引起干扰。最后一类最常见,它包括3种类型的抗体。其中嗜异性抗体是第1类交叉反应免疫球蛋白,它的特点是对多物种免疫球蛋白有较弱的亲和力,且无已知的或明显的可识别的免疫原;第2类是RF,经常在结缔组织病患者中发现,RF对多种免疫分析产生不利影响,常导致假阳性反应(参见凝集部分);第3类是各种类型的抗动物抗体,最常见的是人抗鼠抗体,它可以与鼠源性免疫球蛋白相关的试剂反应[46]。

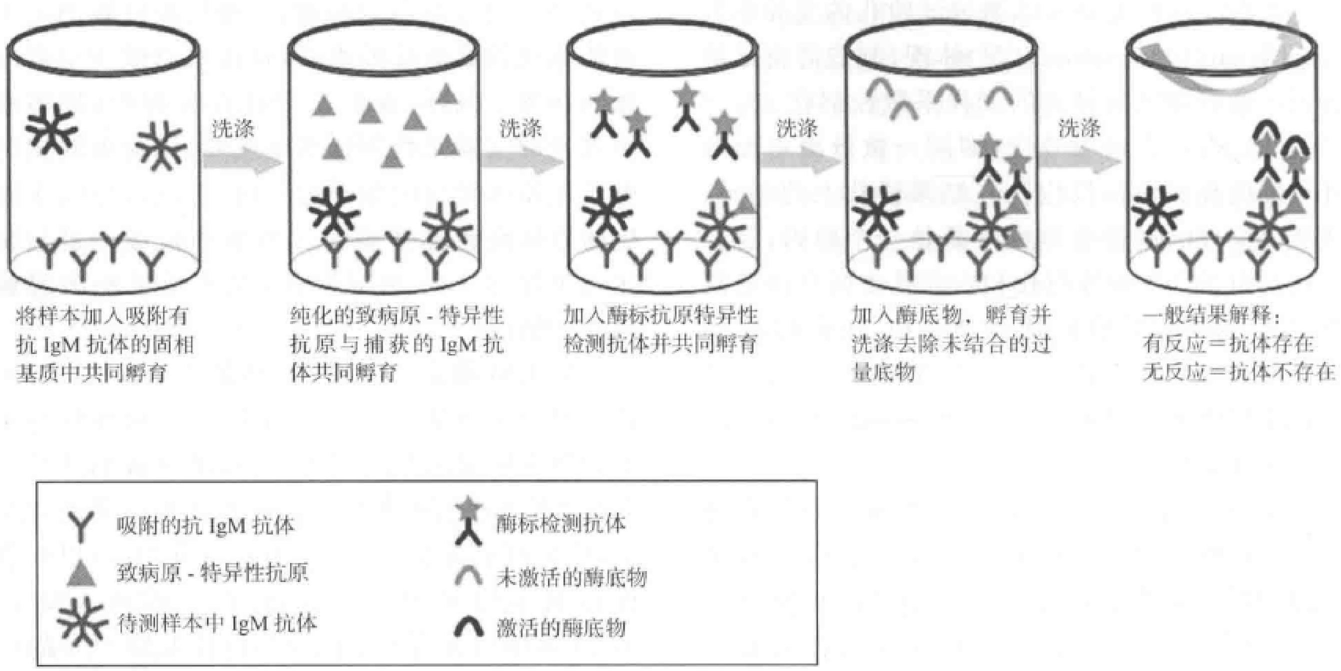


图 8-7　IgM 捕获法 EIA

目前，已经开发了许多技术来减少交叉反应抗体引起的干扰，包括把样品加热到 70℃，灭活标本中的所有抗体，或使用聚乙二醇、蛋白 A 或蛋白 G 沉淀，或对样品进行预处理以消除 RF[47]。预处理技术是临床实验室中最常用的技术，通常是使用某些测试产品说明中的一部分。此外，笔者强烈建议与试剂盒制造商密切沟通，让对方协助解决问题。

5. 生物素干扰　最近有研究表明生物素，也称为维生素 B_7 或维生素 H 过量会对某些临床免疫分析的准确性产生影响。生物素微量存在于许多日常食品（如蛋黄、全谷类食品、叶类蔬菜）中，并且每天的适当摄入量约为 30 μg[48]。然而，越来越多的人（15%～20%）经常服用高达 300 mg 的非处方的生物素补充剂，据报道这些补充剂对头发和指甲的健康有益。此外，最近的研究表明，高水平的生物素可能为多发性硬化症和其他疾病提供支持性治疗[49]。

生物素是一种小分子，可以与各种蛋白质、抗原和抗体偶联而不改变其分析活性，因此，它通常被用于许多免疫分子的检测。生物素对亲和素和链霉亲和素蛋白具有高亲和力，每种蛋白都可以结合 4 个生物素分子，亲和素在已知蛋白质和配体之间非共价结合中作用力最强，进一步解释了这些组分在免疫测定中的广泛应用。但是，根据分析设计的不同，患者标本中过量的生物素可能会干扰使用亲和素/链霉亲和素-生物素化学的免疫分析。下面提供了 2 个例子。

对于某些夹心法免疫分析，分析物首先与 2 种抗体结合，一种标记显色剂，另一种标记生物素，然后通过生物素化抗体与包被链霉亲和素的珠子结合。存在的分析物是在色原酶激活后测定，如果患者样本中存在过量的生物素，则会结合链霉亲和素包被珠，抑制分析物抗体复合物的结合，并导致假阴性结果。第 2 个例子是竞争性免疫分析，其中待测分子与标记的分析物竞争结合生物素标记的抗体。如果待测样品中存在分析物，则其在与生物素化抗体结合强度超过标志分析物，并且复合物与有链霉亲和素的固相载体表面结合；检测到的信号强度与分析物浓度成反比。然而，在生物素升高的患者中，生物素与链霉亲和素结合，抑制分析物抗体复合物的结合，类似地降低信号强度并导致假阳性结果[48]。使用生物素-亲和素/链霉亲和素进行免疫分析的实验室应分析检测方法，以确定过量生物素是否会影响分析性能。重要的是，在检测中使用生物素-亲和素/链霉亲和素并不一定意味着过量的生物素会影响结果。如果这 2 种试剂是在添加患者样本之前“预先结合”在一起，体内升高的生物素的影响将被消除。

(十)自动化免疫分析平台

随着 EIA 市售产品的不断推广,自动化 EIA 分析仪也得到发展。虽然对可用仪器的详细综述不在本章范围,但读者可以参考美国病理学家学会的网站(http://www.cap.org),该网站提供了每种市售免疫分析仪的综合年度评价[50]。这些仪器无论是半自动还是全自动工作平台,都能批量或随机处理样本。其中一些平台也是开放系统,可以由实验室人员直接编程。自动化系统适用于各种固相基质捕获目标分析物,包括微孔板、彩色聚丙烯酰胺或聚苯乙烯珠、磁珠或固相接收物。分析物的检测同样多样化,根据 EIA 试剂盒不同,自动化仪器的设计可通过比色法、化学发光和荧光法检测最终产物。目前,如果有可用的 EIA 基础试剂盒,这些仪器可以进行许多血清学分析,包括但不局限于 HIV、肝炎(甲型、乙型和丙型)、人刚地弓形虫、CMV、麻疹、流行性腮腺炎、风疹和梅毒。越来越多的自动分析仪设计成为可直接与实验室信息系统连接,这样结果报告更容易,同时也最大限度地减少手动录入结果可能造成的错误。

这些自动化平台已经允许实验室增加样本处理量,减少手工操作时间,使结果解释更为标准和客观,通过减少结果回报的周转时间来提高效率。而且,在降低成本的时代,自动化仪器多被设计用于跨临床实验室专业来处理和检测样品。尽管自动化仪器有这些优势,但在临床实验室仍面临各种挑战,包括一个较高的前期购买成本,这在小实验室可能是难以解决的问题。此外,某些自动化平台占地面积大,可能会出现仪器或加样错误,如果仪器出现故障,可能需要备份过程和分析工作。最后,自动化平台有很多测试菜单,检测项目使用不当和结果解释不正确的可能性会增加。这就需要临床实验室与医护人员保持更加密切合作,指导客户正确使用检测项目,并为感染性疾病诊断提供准确的结果解释。

(十一)多重免疫分析技术

在临床实验室,多重免疫分析自动化技术中的应用越来越广泛[51-52]。这些分析和仪器设计使用了多种不同的技术,包括化学发光法、荧光免疫分析、流式细胞术和(或)分子诊断技术等,能够在一个样本中同时快速分析多个待测物。

1. 多重流式细胞分析技术 多重流式细胞分析技术(multiplex flow immunoassay)是这类分析中的一种,它用微球作为固相基质,每个微球包含不同的荧光指示剂。

根据特定的待测物,球体包被一个独特的捕获分子(抗原或抗体),然后以任何复合物方式加入到患者标本中。孵育后,加入与目标待测物特异结合的荧光标记二抗,再用流式细胞仪分析微球。每个珠子包被相应的抗原,通过其独特的荧光染色来标识,通过二抗是否产生荧光来判定目标待测物是否存在。多篇报道描述了该技术用于麻疹、流行性腮腺炎(mumps)、风疹(rubella)、水痘-带状疱疹病毒(varicella zoster virus)或 HSV-1 和 HSV-2 的 IgG 类抗体的多重检测及单一反应中其他联合应用[53-56]。

2. 免疫 PCR 免疫 PCR(immuno-PCR,IPCR)分析系统是一个具有多重检测能力的新兴的高度自动化系统。这种新技术将传统的 EIA 方法与 PCR 技术相结合[5,6,43,57-64]。它遵照标准的 EIA 方案,其中二抗直接连接核酸标记,而不是酶标记。二抗所连接的 DNA 随后通过 PCR 反应扩增,而 PCR 产物的量与样品中目标物的待测物的量成正比[65]。这是一项超灵敏的技术,在某些情况下,检测水平达到阿克(10^{-18} g),并已被应用到检测多种病毒和细菌病原体中[如 HIV、轮状病毒(rotavirus)、金黄色葡萄球菌蛋白 A(*Staphylococcus aureus* protein A)、诺如病毒(norovirus)、志贺毒素(Shiga toxin)][65-66]。IPCR 检测朊病毒蛋白质的能力也得到认可,这是采用现有方法很难检测的[44,63]。尽管 IPCR 具有潜在的优势,但在临床实验室广泛应用这个技术之前,仍面临许多必须应对的挑战。这些局限性包括:由于非特异性相互作用造成的高背景反应性、一般涉及多个步骤、可能会导致操作错误的复杂检测方案、仪器成本高,以及扩增 PCR 产物可能造成样本交叉污染。未来技术不断地发展将会解决这些潜在问题。

(十二)自动化免疫分析平台的注意事项

如前几节所述,针对感染性疾病的血清学试验的性能已经取得了重大进展,包括提高了自动化平台的使用率。虽然这些平台以标准 EIA 的自动化

处理仪器为主，但其他平台已经将更先进的技术引入免疫分析领域，包括多重流式细胞分析技术。这些自动化仪器显著增加了样本处理量，减少了技术人员的手工操作时间和人体工程学风险，消除抄写错误的风险，提供更好的标准化，通过减少结果回报的周转时间来提高效率。而且，在降低成本的时代，自动化仪器多被设计用于跨临床实验室专业来处理和检测样品。

尽管有这些优势，自动化仪器在临床实验室仍面临各种挑战，包括一个较高的前期购买成本，这在小实验室这可能是难以解决的问题。如果还需要考虑仪器故障，仪器冗余或备份计划，如手动执行分析（如果可能），这将给实验室带来额外的前期成本。很多自动化平台占地面积大，在这个经济效益和空间限制并存的时代，有效协调对实验室来讲具有挑战性。最后，自动化平台有很多测试菜单，检测项目使用不当和结果解释不正确的可能性会增加。这就需要临床实验室与医务人员保持更加密切的合作，指导客户正确使用检测项目，并为感染性疾病诊断提供准确的结果解释。

（十三）快速免疫分析

随着多种分析物的快速免疫分析技术的发展，免疫诊断试验已经出现彻底的变革，而之前这些分析物只能在大型参考实验室进行检测。许多这样的试验在 CLIA 规则中是豁免的，可以作为床旁检测在 15～30 min 内完成[28,67-74]。这些试验已经被设计成各种形式，能够检测抗原、抗体，甚至核酸扩增产物。

最流行的方法之一是免疫层析法，通常称之为侧流免疫层析法（lateral-flow immunoassay，LFA）。一步法分析使用含有三区的层析垫：加样区，结合垫和反应区（图 8-8）。样本（如血清、脑脊液和尿）加到样品区，通过毛细管作用侧向流动。结合垫上是标有特异标记的冻干抗体或抗原（由目标分析物而定），在反应区产生一个可见的信号。常用的偶联物包括胶体金颗粒或乳胶颗粒。如果存在目标分析物，它将与标志检测物结合，由此产生的免疫复合物通过毛细管作用迁移到反应区。

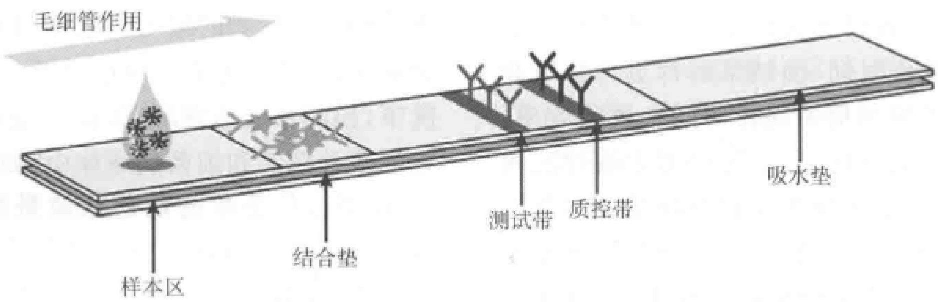


图 8-8 LFA

反应区包括 2 个位点：与目标分析物结合的二抗或特异抗原区，以及与偶联分析物特异结合的质控抗体区。捕获的免疫复合物引起检测颗粒的浓集，并在 2 个区域形成有颜色的条带，提示为阳性反应；质控带出现，表明阴性反应；而质控带缺失，表示为无效测试。

随着这种试验形式的多样化，检测系统不需要进行单独的静脉穿刺或标本采集程序。通常将一个手指贴到检测仪器上，与一步测流试验层相结合就可以。快速检测模式对 HIV 检测尤其有利，已广泛用于不发达国家的 HIV 检测。最近，已开发了 LFA 用于各类标本中细菌、真菌和寄生虫抗原的检测：嗜肺军团血清 1 型（*Legionella pneumophila* serogroup 1）（尿）、肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）（尿或脑脊液）、隐球菌抗原（血清或脑脊液）、烟曲霉菌（Aspergillus fumigatus）（血清和支气管肺泡灌洗液）和疟原虫（*Plasmodium* spp）（血清）。

总的来说，快速检测易于操作，价格低廉，不需要特殊仪器。LFA 特别适合用于床旁检验，可长期用于家庭妊娠测试和近期用于口腔分泌物中 HIV-1 或 HIV-2 抗体的检测，将来可能被用于某些感染病的家庭个人检测[75-76]。虽然 LFA_S 比传统的 EIAs 敏感性低，但一些快速检测研究显示，

其敏感性接近传统的检测方法[68]。快速检测的局限性包括：仪器不能自动化和结果解释的主观性。特别是在几乎看不到条带的样品测试，包括通过发光二极管技术的照明系统读取荧光信号的快速免疫分析测试，需努力改善测试结果解释的主观性[77]。

五、总结

尽管在过去十年里分子诊断学取得了长足的进步，但免疫诊断学仍然发挥着重要的作用，特别是对于不能在临床实验室培养或核酸扩增试验仍然不敏感的致病因子的检测。如本章所述，在感染性疾病血清学试验领域中所使用的方法和技术是多种多样的，从经典的 ID 和 CF 检测到基于多样的以珠子为基础的免疫分析技术检测，以及在将来可能应用的免疫 PCR 技术。由于没有完善的免疫分析方法，了解这些方法的优点和局限性是很重要的。此外，随着免疫诊断学的每一次发展，该领域的免疫分析自动化平台数量也在增加，这将会显著提高检测的标准化程度和检测的整体质量。

然而，对感染性疾病的血清学结果解释是具有挑战性的。抗体或抗原的存在与否必须与患者的表现，包括暴露史、先前的疫苗接种史、年龄、临床症状和免疫状态一起进行评估。要清楚地了解宿主对单一感染因子的体液免疫反应，包括血清转化的时间，这在不同感染因子之间可能有所不同，了解密切相关生物体之间的抗体交叉反应的可能原因也一样重要。由于多数情况下血清标本易于采集，使得血清学试验应用过度，特别是在一些感染因子的预检率很低的情况下。因此，实验室要制定和传达合适的检测方案（如诊断试验流程），并为血清学测试结果提供指导意见。

参考文献请扫二维码查阅

第 9 章　医院感染的预防

DANIEL J. DIEKEMA, MICHAEL A. PFALLER

（赵宗珉　译；罗燕萍、徐春晖　审校）

医疗保健相关感染（health care-associated infection，HAI）（或医院内感染）是医疗工作最常见并发症之一（译者注：根据当前国际普遍观点和我国最新的名词解释，本章将"HAI"翻译为"医院感染"）。美国每年收住急症医院的患者中，大约 70 万人发生医院感染[1]。世界卫生组织报告，全球范围内医疗机构获得感染者每年大约数百万人，据此估计，住院患者中平均 HAI 患病率为 10.1%[2]。因此，每个医疗机构都应有感染预防计划（infection prevention program，IPP），包括对医疗场所内发生的感染进行监测、预防与控制传播。鉴于感染预防工作需要具有识别感染和潜在微生物定植患者的能力，因此临床微生物实验室（clinical microbiology laboratory，CML）与所有综合性感染预防计划都密切相关。这一章将讨论医院感染对医疗机构费用和患者预后的影响、概述医院感染预防计划的构成，并介绍临床微生物实验室在医院感染预防中的重要作用。

一、医院感染（或医院内感染）

（一）定义

医院感染是指在医院或医疗机构内获得的感染（即在接触医疗机构环境时未发生感染，或不处于潜伏期）。对于大多数细菌感染而言，入院超过 48 h 后出现症状，为医疗机构内获得感染的证据。为确定某些感染（如军团菌病）是否与医疗活动相关，必须考虑通常潜伏期的长短，以明确患者在哪段时间内是否暴露于医疗机构环境。由于住院时间变得越来越短，且在门诊接受治疗的患者越来越多，因此，许多医院感染在住院期间不能被识别出来，或者医院感染可能与非急症医院的其他医疗机构（如日间手术中心、透析中心、长期护理院）相关。因此，感染预防计划必须制定策略，有效监测门诊患者，以获取准确的医院感染发生率[3]。

（二）感染率、感染部位、主要病原体

5%～10% 的患者在急症医院住院期间获得感染[1-2,4]。在最近的一项美国医院时点患病率调查中，最常见的是肺炎和手术部位感染（surgical site infection，SSI），各占全部医院感染的 21.8%，艰难梭菌是最常见的病原菌（12%）[1]。很多医院感染与医疗器械（如导尿管、机械通气患者的气管插管、中心静脉导管）有关。因此，为比较不同时间或不同机构同类病区间的感染率，美国 CDC 推荐以器械使用天数为分母，计算重症监护室（ICU）的医院感染率（有关常见流行病学术语的定义见表 9-1）以调整此危险因素。

表 9-2 列出美国医院中不同感染部位分离的 4 种最常见细菌性病原体[5]。然而，医院感染的病原谱在不断改变，且在不同地区甚至不同医院之间，病原体也有所不同[6]。1970—2000 年，医院感染的病原体从以革兰阴性菌为主转向以革兰阳性菌为主，念珠菌成为一个主要难题[7]。随着葡萄球菌和肠球菌对抗菌药物耐药性的增加，这 2 种菌引起的医院感染的发病率也在增加[8]。最近，多重耐药革兰阴性杆菌（multidrug-resistant gram-negative rods，MDR-GNRs）在许多医院已越发常见[9-11]。例如，2010—2014 年，美国国家医疗保健安全网（National Healthcare Safety Network，NHSN）的数据显示，在大多数医院感染类型中，超过 60% 的不动杆菌属为多重耐药和碳青霉烯类耐药[5]，而近期的 CDC 报告显示，在美国，医院内肠杆菌科细菌中碳青霉烯类耐药的菌株比例增加了 4 倍，自 2001 年的 1.2% 上升至 2011 年的 4.2%[12]。

表 9-1 医疗保健流行病学常用术语

术语	定义或概要
流行病学	是研究特定人群中健康状况、疾病的发生、分布及其决定因素的科学。医院/医疗保健流行病学是研究医院/医疗保健系统中疾病发生、分布的科学
医院感染	在医院或其他医疗机构中获得的感染
地方性感染	特定人群中所发生的感染，与平时/常见的感染发生率一致
流行性感染	特定人群中感染的暴发(或流行)，定义为感染的发生率显著超过平时水平发病率
发病率	一段时期内，一定人群中感染新病例与全部存在风险人群(分母)的比例
标准化感染比	经过与感染率相关变量的校正后，一定人群中实际感染病例与预期感染病例的比
器械相关感染发病率	一段时期内，一定存在风险的人群中器械相关感染新病例与器械使用天数的比例
现患率	某特定时刻内(点患病率)或特定时间段内(期间患病率)，存在风险的特定人群中总的感染病例所占比例
观察性或描述性研究	不给予干预，对研究对象的自然发展特征进行的研究
病例对照研究	常作为感染暴发调查一部分的研究，将发生某一结局的患者(如医院感染案例)与不存在这一结局的对照组比较。2 组间特定因素(如研究的暴露因素)的比较可提示感染发生的原因
粗或全因死亡率	特定人群中总死亡人数与总人数之比
归因死亡率	某一特定疾病直接造成死亡的人数与所有患此疾病患者数之比

表 9-2 2011—2014 年上报至美国国家医疗保健安全网的 4 种主要感染部位最常见的医院内病原菌分布[a]

感染部位及病原体	每一感染部位所占比例(%)
中心导管相关血流感染	
肠球菌属	17.2
CoNS[b]	16.4
念珠菌属	14.3
金黄色葡萄球菌	13.2
肺炎克雷伯菌/产酸克雷伯菌	8.4
呼吸机相关肺炎	
金黄色葡萄球菌	24.7
铜绿假单胞菌	16.5
肺炎克雷伯菌/产酸克雷伯菌	10.2
肠杆菌属	8.3
鲍曼不动杆菌	6.6
导尿管相关尿路感染	
大肠埃希菌	23.9
念珠菌属	17.8
肠球菌属	13.8
铜绿假单胞菌	10.3
肺炎克雷伯菌/产酸克雷伯菌	10.1
手术部位感染	
金黄色葡萄球菌	20.7
肠球菌属	14.6
大肠埃希菌	13.7
CoNS	7.9
铜绿假单胞菌	5.7

注：[a] 数据来自参考文献[5]；[b] CoNS. 凝固酶阴性葡萄球菌

在引起医院感染的病原菌中，有一组病原菌因其常见且高耐药性而备受重视，被称为 ESKAPE 病原菌(包括屎肠球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和肠杆菌属)，占导致 ICU 患者发生医院感染病原菌的 70%[6,10]。ESKAPE 病原菌中最受关注的是 MDR-GNRs，包括产超广谱 β 内酰胺酶(extended spectrum β-lactamase，ESBL)和产碳青霉烯酶的肠杆菌科、MDR 或泛耐药非发酵菌(如铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌)[9,11]。快速准确识别这些关键的医院感染病原体，包括它们的多重且高度复杂的耐药机制是保障患者获得适宜的护理和预防效果的关键[13]。

(三)发病率、死亡率与费用

医院感染每年可导致数千人死亡[1-2]。具有最严重基础疾病的患者，也最易发生医院感染，因此，很难估算粗死亡率或全因死亡率中直接归因于医院感染比例。那些通过仔细控制诸多潜在的混杂变量以解决此问题的研究，称为归因死亡率研究。据估计，医疗保健相关血流感染的归因死亡率如下：凝固酶阴性葡萄球菌 14%[14]，万古霉素敏感和耐药肠球菌属(vancomycin-resistant enterococci，VRE)感染分别为 31% 和 37%[15-16]，念珠菌感染为 38%～49%[7,17-18]。

医院感染同时增加了医疗费用和住院时间。

一项近期 CDC 报告显示，美国医院中每年医院感染直接产生的医疗费用估计为 284 亿～338 亿美元[19]。2013 年的荟萃分析发现，在美国，中心导管相关血流感染（CLABSI）是花费最多的医院感染，每例超过 45 814 美元，其次是呼吸机相关肺炎（40 144 美元）、SSI（20 785 美元）、艰难梭菌感染（CDI，11 285 美元）和导管相关尿路感染（896 美元）[20]。每种类型感染住院的最长时间从 CLABSI 的 10.4 天到 SSI 的 11.2 天不等，呼吸机相关肺炎 2 周左右[20]。

实施感染预防计划的前提是众多威胁生命、花费高昂的医院感染是可预防的。"医院感染控制效果研究"（Study of the Efficacy of Nosocomial Infection Control，SENIC）的标志是：一项积极的感染预防计划的出现和医院感染发生率降低 32%呈相关性，而无此计划的医院，医院感染增加 18%[21]。20 世纪 90 年代，美国 CDC 的国家医院感染监测（NNIS）系统报告，对 ICU 所有部位（尿道、血流、肺）的感染，调整危险因素后，感染率均有所下降。促进感染率降低的重要因素，包括在高危人群（使用标准化定义）中进行目标性监测、配备足够数量的经培训的感染预防师（infection preventionists，IPs），并由其向医务人员告知感染率、针对评估感染率时发现的问题提供为解决问题设计的预防措施[22]。近来，文献证明使用循证预防措施组合（"bundles"）的医院，器械相关的医院感染率较预想情况降得更低[23-24]。例如，美国密歇根州超过 100 家 ICU 的合作研究显示，中心导管相关血流感染（CLABSI）率降低了 2/3，参与的 ICU 中 CLABSI 感染率的中位数降至 0[24]。CDC 最近报告指出，广泛使用这种预防措施组合可能与医院感染率的持续降低有关[包括 CLABSI，SSI，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）血流感染和 CDI][25]。因此，尽管医院感染中真正能预防的比例尚不清楚，但是有效的感染预防计划显然可以改善患者的医疗、拯救生命、降低医疗费用。

二、医院的感染预防计划

（一）结构、人员、职责

医院感染预防计划的职责包括监测与预防医院感染、医务人员的继续教育、控制感染暴发、保护工作人员和探视者免遭感染，以及为新产品及流程提供建议。此计划通常由临床流行病学专家领导，由医院感染预防委员会推进。每家医院还必须有感染预防人员，由 1 名到多名感染预防师组成。感染预防师的工作包括协调医院感染的监测、预防等事宜，并将数据提供给感染预防委员会。

感染预防计划所必需的基础设施的详细指导，以及医院流行病学专家的技术和能力要求不在本章节介绍。这部分内容一直由美国卫生保健流行病学学会发布[26-27]，并且在与医院管理部门探讨初始建立感染预防计划时非常有用。在这种探讨中也要考虑到许多感染预防计划也需要负责一些非急症护理机构（如诊所、长期护理机构、长期急症护理机构）的感染预防工作。这些机构可能没有足够的资源雇佣全职感染预防师或临床流行病学专家，并且绝大多数没有临床微生物实验室。这些困难需要保健部门和卫生行政部门的密切合作并建立网络系统来解决。

（二）感染预防委员会

感染预防委员会负责医院感染数据的报告、评估，以及感染预防相关政策、流程、指南的起草及落实。委员会应包含多学科，由所有部门的代表组成，包括临床微生物学，并应每 1～3 个月会面，根据所评估医院特定医院感染数据制定相关政策。成员提出所在科室的需求与观点，并带回感染预防措施、政策的重要信息。委员会的其他职责包括感染预防有关新产品、设备或流程的技术性信息评估，并在感染暴发或相关紧急状态时，设立所有必要感控措施。

医院的临床微生物专家或无博士学位医疗机构的微生物学主管是感染预防团队中不可缺少的成员，因此，一定要成为感染预防委员会的积极分子。由于感染预防委员会的决策常常依据微生物学检验结果，临床微生物学家应就如何整合培养结果、哪些微生物学方法可以解决特定感染预防问题指导委员会成员。感染预防人员若能理解微生物学的常规流程（如血、伤口、尿培养的时间安排及相关技术）将对微生物学实验室有利[28]。标本处理的流程可使感染预防人员理解特定结果不同的 TATs、微生物检测的时间限制，并教会他们何时可对常规培养进行后续信息查询，以减少过早给实验室打电话询问培养结果的情况。反过

来，通过参与委员会工作，微生物学家可了解感染预防人员所面对的问题，因而能更好地组织实验室进行应对。

此外，检测方法、试剂或仪器的改变均可明显影响实验室医院感染病原检测和特征描述的水平，微生物学家应将这些变化通知委员会，包括：诊断试验敏感性与特异性的改变、药物敏感性试验(antimicrobial susceptibility testing，AST)解读标准的改变，以及可能造成混淆的命名变更。其中一个检测与报告标准改变直接影响感染预防方法的例子是几年前CLSI[29]与EUCAST[30]均更新了肠杆菌科细菌对头孢菌素与碳青霉烯类药物的折点，最新的(更低的)折点目的在于对于临床应用不再需要ESBL及碳青霉烯酶确认试验。实验室采用变化后的检测和解读标准不再常规确认或标记产ESBL菌株和产碳青霉烯酶菌株，会造成多重耐药菌感染预防计划使用的流行病学数据缺失[31]。折点的变化也会导致头孢菌素类和碳青霉烯类耐药菌株数增加，对感染预防产生重要影响[32-33]。作为结果，据一家医院报道，这一改变使得MDR-GNR数量增加35%，接触隔离措施随之增加[32]。

其他对感染预防计划造成重要影响的是最近检测方法的变化，包括广泛采用敏感的PCR检测艰难梭菌及MALDI-TOF MS鉴定微生物。在许多机构更敏感的艰难梭菌检测将CDI诊断率提高50%～100%[34]，MALDI-TOF MS带来的微生物更精准的鉴定可以影响血培养阳性结果的解释和中心导管相关血流感染率[35]。

感染预防团队需互相交流以实现其目标。IPP成员定期访问实验室并提出问题、查看检测结果、讨论当前问题和各自观点可提高交流的效果。同样，微生物学专家应参加IPP成员讨论流行病学原理和同期热点问题的会议。遗憾的是，一些流行趋势阻挠了这些微生物与感染预防人员间有意义的干预[33]。临床生物实验室服务项目的合并、微生物实验室迁往异地、对电子病历系统的完全依赖以至缺乏第一手观察(如查看培养基生长情况或革兰染色结果)资料，常常将临床医生和感染控制人员拒于微生物室门外，而同时也让微生物学家只局限在实验室内。

(三)医院感染的监测

医院感染主动监测项目与感染率，以及后续发病率与死亡率的下降相关[21]。美国国家及各州的审计机构要求参与医疗保险计划的医院对医院感染率进行监测，并公开报告特定医院感染率[36]。此外，医院感染率在“按业绩奖惩”项目中已成为奖励和惩罚医疗机构的指标[37-38]。表9-3列举了由CMS制定的“按业绩奖惩”包含的医院感染指标。总之，高达3%的CMS支出存在风险，对于一个每个大型医疗中心这笔费用可达数百万[35]。

表9-3　将报销与医院感染指标挂钩的项目特征(2017财年)[a]

项目	奖惩风险金额	能否获得激励措施	包含的医院感染
基于价值导向的采购	费用的2%	能，该计划将资金从绩效低下的人重新分配到绩效高的人	导尿管相关尿路感染 中心导管相关血流感染
医院内发生事件削减	费用的1%	否，只能惩罚。针对最差的后1/4	手术部位感染(结肠/子宫)[b] 艰难梭菌感染[c] MRSA菌血症[c]

注：[a] 改编自数据来自参考文献[35]；[b] 结肠手术和腹部子宫切除术的手术部位感染率；[c] 度量标准是NHSN LabID事件

因此，由于发病率、死亡率和费用的原因，医院感染的系统监测是感染预防计划最重要的内容，也是开销最大、最费时的工作。系统监测可使感染预防计划监测医院感染的发生频率和类型、发现暴发、评估感染预防指南的依从性，为制定政策提供资料并监测预防措施对医院感染率的影响。为实现降低感染率的总体目标，感染预防计划需尽早为临床医生提供监测结果，并附上改进建议与现有可用的感染控制措施。感染预防计划可将所在医院感染率与由CDC NHSN汇总、报告的全国医院感染基准数据比较[25]。图9-1为一ICU CLABSI率与全国基准数据比较的示例格式。对于可报告的医院感染，CDC利用标准化感染比(SIR)作为一种随时间进行的追踪医院感染

和对比医疗机构间医院感染率的简要措施(医疗保险和医疗补助服务中心在按业绩奖惩项目中使用标准化感染比)。标准化感染比是观察的感染数与预期感染数的简单比值,其中预期感染数可通过使用已知与医院感染率相关的不同因素调整模型得到[39]。感染预防计划应提供感染率和降低感染率的建议,并协助病区工作人员(如医疗主管、护士长及临床医生等)实施干预措施。

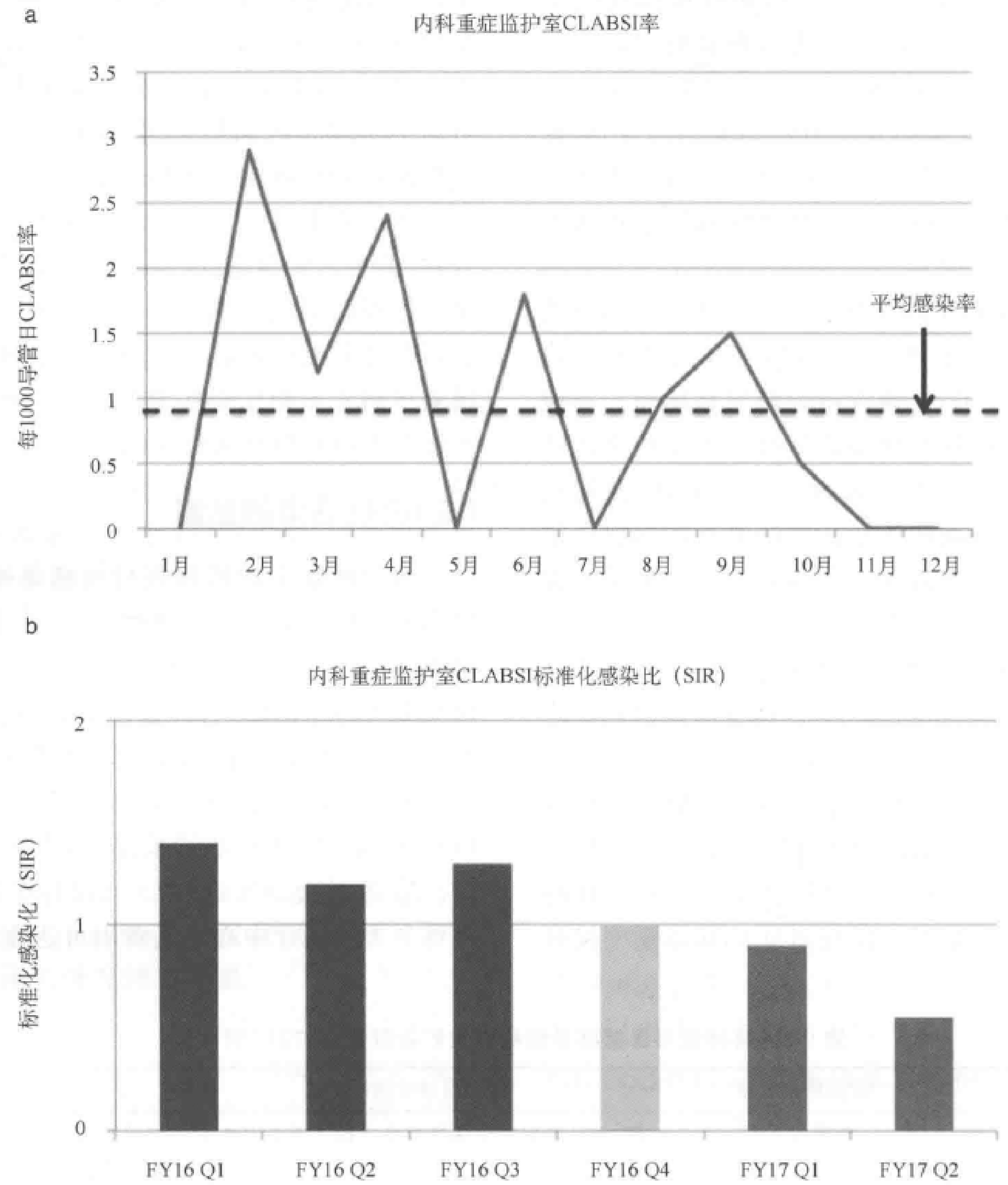


图 9-1 报告模板

注:a. ICU 内每月及平均中心导管相关血流感染率;b. 标准化感染比(SIR)为使用 CDC NHSN 数据计算观察到的感染人数除以每个时间段的预期感染人数。条形图的颜色代表了 SIR 与全国相似病区基准比较的不同之处:红色,劣于;黄色,无区别;绿色,优于,见彩插

感染预防计划应设计与州和联邦要求相符的、适应医院特定需求且预算合理可行的监测系统。由于监测所消耗的资源比其他感染预防工作多,感染预防计划应尽可能设计最高效的监测系统。最完备和准确的监测工作要求感染预防师每日查看所有住院患者的病史,但除了在最小的医院外,这一方法显然不切实际。感染预防计划应集中有限的资源用于最高危区域(如重症监护室、血液病科或肿瘤科、烧伤及器官移植科),并采用不同筛查技术以增加监测效率。感染预防师可使用不同信息来源(如微生物学报告、护理计划、抗菌药物处方、影像学报告、生命体征记录及出院诊断)来决定需进一步查阅哪些病历。数据可来自更多的资源,医院感染监测可使用计算机决策支

持后续再由感染预防师进行验证，这些途径均可使越来越多的医疗信息系统为医院感染监测带来便捷。

回顾微生物学数据也许是最常用于发现感染病例的单一方法，估计有超过80%的医院感染可以通过回顾分析实验室阳性培养结果得以证实[28]。另外CDC的NHSN现在也将实验室报告数据作为追踪卫生保健机构相关耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和艰难梭菌的实验室确诊事件的指标。这些NHSN定义只包括阳性检测结果和入院日期及科室信息，没有额外的患者临床信息[40]。努力减少主观性，方便电子报告，未来定义的改变可能会更多依赖于电子医疗记录的客观结果，如实验室检测结果，而更少强调临床症状。尽管在医院感染定义中减少主观因素的倾向值得认可，但临床微生物实验室应该注意到感染预防计划中基于实验室检测的监测的敏感性和特异性取决于临床医生留取培养的频率、所采用的测试方法特性，以及实验室接收到的培养标本质量[35]。

医院感染率公开曝光的增加[36]和基于医院感染率的业绩奖惩项目[37-38]增加了医院展现HAI下降的压力。这一趋势对监测和临床微生物实验室的作用产生重要的影响[35]。为使不同医院间医院感染率的比较存在意义，所有医院均需使用相同监测方法并行风险调整，医院感染的定义也必须尽可能地客观，以不受主观"游戏"因素的影响[36]。遗憾的是，不同医院感染监测方法差别很大，并且仍在研究经过验证的风险调整率方法[41]。此外，有报告显示，微生物实验室受到了通过改变诊断方法以达到降低医院感染率为目的的压力，甚至以牺牲检测性能为代价，这种现象呈增多趋势。例如，要求临床微生物实验室管理者采用敏感性低的诊断方法检测艰难梭菌以减少可报告的CDI病例，或采用规定对所有新入院患者均进行尿培养以证明阳性结果为"入院已存在"(即，并非医院感染)[35]。这种报道非常常见，以至于CDC和医疗保险和医疗补助服务中心发表联名信警告医院"为了避免向NHSN报告感染而不采取标准化诊断措施，会置患者于危险之中"导致"使用不必要的抗菌药物，比如治疗细菌定植而不是感染，或者未根据培养结果使用抗菌药物"[42]。因此，尽管公开和基于医院感染率的业绩奖惩项目是值得称赞的，但仍有许多工作需要开展，以确保预防医院感染的措施得以改进而不是阻碍了预防医院感染的努力[35-36,41,43]。

所有健康护理机构的总体监测方法应由感染预防委员会根据患者治疗类型、手术方案、可提供的监测资源、流行感染率、政府授权，以及其他因素决定及调整。监测的方法需在感染预防计划和感染预防委员会每年举行的"风险评估"中重新评估，而且，在与临床微生物实验室人员的协商后，感染预防委员会应确定由临床微生物实验室提供可供监测的具体信息机制。

(四)过程监督

几项近期的研究清楚表明，实施循证感染预防措施(例如，良好的手卫生[44-45]、依据指南留置和护理中心静脉导管[23-24])可显著降低医院感染率[23-24,45]。这些研究的明显意义在于，医务工作者并不常规地遵循这些最安全的医疗流程。因此，感染预防师不仅需监测重要结局(感染)，还需监督重要过程(例如，手卫生依从率、放置中心静脉导管时使用最大无菌屏障)。这一过程可帮助感染预防人员理解医院感染率变化的部分原因。此外，向医务人员报告依从率可改进医疗实践、降低医院感染率。

(五)抗菌药物管理计划

现在，美国每家医院都必须有抗菌药物管理计划(antimicrobial stewardship program，ASP)，不仅为联合委员会认证，而且作为医疗保险和医疗补助服务中心"参与的条件"，ASP的指南由美国感染病学会与美国医院流行病学协会颁布[46]。表9-4描述了临床微生物实验室为ASP项目提供的最重要的支持类型，同时也是这些指南中所推荐的。值得注意的是，支持这些推荐的证据非常有限，这表明通过进一步研究来明确临床微生物实验室支持抗菌药物管理和改善患者预后的最有效方法的重要性。然而，抗菌药物管理直接依赖于临床微生物实验室出具的报告，因此，实验室、药剂科、感染预防人员及管理团队的良好沟通极为重要[47]。为指导经验性抗菌药物使用，应定期(至少每年)更新整个医院和各科室的抗菌谱，以满足临床医生所需。这些抗菌谱数据也可评估重要抗菌药物耐药率的变化趋势，并教育临床医生如何优化抗感染治疗方案。这些结果可以用表格

的形式展现，其中既包括根据解剖部位和医院服务地点确定的医院感染最常见病原菌的抗菌药物种类，也包括抗菌药物剂量和费用等信息。这些信息可帮助临床医生经验性选择抗菌药物治疗，并帮助抗菌药物管理计划制定本地区的治疗指南。CLSI已发行关于抗菌谱制定的相关指南和抗生素配制指南[48]。

表 9-4 抗菌药物管理计划中实验室提供的支持推荐意见[a]

推荐	证据强度/质量	注释
制定和发布分层耐药谱	弱/低	发布重要药物敏感性差异优化经验性治疗推荐方案
实施选择性和逐级报告药物敏感结果报告	弱/低	指导临床医生首选治疗方案，根据病原体检测结果使用窄谱药物
实施呼吸道病原体快速病毒检测	弱/低	当确诊病毒感染时，减少因疑诊细菌感染而不合理应用抗菌药物的情况
采用快速诊断试验以补充阳性血培养常规报告	弱/中	与主动抗菌药物管理计划相结合，缩短对血流感染优化抗菌药物治疗所需时间
对于ICU疑似感染的成人患者给予连续的降钙素原检测	弱/中	如果与抗菌药物管理计划的算法一起实施，可以缩短抗菌药物治疗疗程
对血液系统恶性肿瘤的高危患者进行非培养的真菌标志物检测	弱/低	团队良好合作下可优化抗真菌药物在高危人群的使用

注：[a] 总结自参考文献[46]

针对性抗菌治疗需要患者个体化的细菌培养和药敏结果。这样可在日后将抗菌药物使用情况反馈给处方者有效管理的主要挑战在于如何迅速、高效地从实验室获得药敏测试结果。如下所述，通过快速分子学和蛋白组学方法的对病原体和抗菌药物耐药进行检测和鉴定将有助于减少这些数据的回报时间，并带来靶向抗菌治疗效果的提高[49-50]。但是，缩短检测结果回报时间只有在将所获得的信息快速整合入抗菌药物管理中时才能发挥作用。一个有效的利用计算机决策支持系统的抗菌药物管理计划通过在出现使用限制性抗生素时，向管理部门自动发出诸如患者所在科室、患者所接受的其他治疗措施和合理的临床微生物实验室结果等警示而使管理过程流水线化[46,51-52]。其他的警示可能包括患者正在接受的已知病原体或潜在病原体的双重抗菌药物覆盖或未进行抗菌药物覆盖、静脉转口服的药物序贯时机的识别、未发现可能病原体时停止抗菌药物治疗的时机识别。一项抗菌药物管理计划显示，利用计算机决策支持系统的抗菌药物管理计划与未利用计算机决策支持系统的抗菌药物管理计划相比，可使医院每年节省超过60万美元[52]。更为重要的是，这些逐渐积累得到的数据证明积极的抗菌药物管理计划可以降低发生CDI的风险，以及耐药病原体所致感染或定植的风险[53]。

三、临床微生物实验室在感染预防中的作用

了解医院感染预防计划框架及内容后，现在来关注临床微生物实验室的日常工作在感染预防中所扮演的最重要、具体的角色。

（一）标本采集与转运

许多医院感染病原体（如凝固酶阴性葡萄球菌）常定植在患者皮肤或黏膜，若未正确采集、处理标本，很容易导致污染。若污染菌被误认为病原菌，感染预防师将不可避免地将其视为医院感染，误使感染率虚高[28,54-55]。因此，实验室需提供临床标本采集、转运的指南（第19章）。强调拒收标本标准和加强控制血培养污染率、标本转运时间监控的质量保障项目有助于优化检测的分析前阶段。

（二）医院感染病原体的准确鉴定和药敏试验

商业化的鉴定和药敏试验系统使多数实验室能将微生物鉴定至菌种水平，并进行药敏试验（第5章，第75章）。然而，重症患者定植和感染的微生物谱扩大，挑战了临床微生物实验室准确鉴定、

鉴别医院感染病原菌特征的能力。因此,实验室常常需要更新医院感染病原的鉴定方法。

微生物鉴定到种水平的正确程度对医院感染控制有重要作用。感染预防包括对患者之间微生物传播及其他来源(环境、工作人员)的微生物传播到患者的证据保持警惕[33,56]。微生物鉴定至菌种水平将增强对这些事件的发现能力。由于不常见菌的集聚或菌的不寻常集聚可作为感染暴发线索,能将医院感染病原鉴定至菌种水平的实验室可发现原先不能发现的感染暴发。此外,病原菌不完整或不正确的鉴定或许会掩盖真正问题,使回顾性流行病学调查无法进行。商品化系统常常不能可靠鉴定少见微生物及表型特征不典型的常见微生物,准确鉴定需使用分子或蛋白组学方法。蛋白组学方法(MALDI-TOF MS)已使许多实验室鉴定病原体的能力准确到种的水平。然而,即使这样,这些检测方法依然受到某些病原体或病原体复合群的挑战(如肺炎链球菌和缓症链球菌、大肠埃希菌和志贺菌[57-58])。因此,随着病原体不断进化和分类学方法的修订,微生物学家应关注制造商有关产品的通信文件,如有关测试方法准确性的信件、通知、不能测试的情况,以及其他使用鉴定系统者在已发表文献中对遇到问题的描述。

日益准确的病原种的鉴定可以给感染预防计划带来一些意外结果。首先,一些以前被归为某一大类的种(如类白喉菌)现在可以由 MALDI-TOF MS 准确识别。在极少数情况下,对微生物鉴定到种的名称可影响到该病例是否符合 NHSN 定义的医院感染的标准。例如,如果血液培养生长"类白喉菌",现在就可以给出准确的菌种名称。如果该菌并不在 NHSN "常见共生菌"列表中,则可将其从"污染菌"重新分类到 CLABSI。其次,一些凝固酶阴性葡萄球菌的少见菌种未在 NHSN 微生物数据库列出,这可能使感染预防师或审核者在回顾分析医院感染分类时发生混淆。最后,报告给临床的菌种名称可能会因医生不熟悉导致过度治疗或困惑(如佩滕科夫葡萄球菌即常见的"凝固酶阴性葡萄球菌"),因此实验室和感染预防计划人员应采取措施以限制困惑的发生,包括在某些情况下,不仅需要报告准确的种的名称,也需要报告临床医生和感染预防师更熟悉的菌种"群"和复合群的名称。

随着新的耐药不断产生、现有耐药频率增加,为防止药敏试验报出微生物-抗菌药物组合的明显错误,实验室必须采取其他方法对自动化系统进行补充(第 73～76 章)。药敏试验错误最有可能出现异质性耐药、诱导性耐药或新机制的耐药。例如,当葡萄球菌对万古霉素耐药或克雷伯菌对碳青霉烯耐药这些表型刚出现时,自动化系统的检测表现不佳[59-60],必须进行补充试验或确证试验,如果实验室采用的检测方法不能准确鉴定微生物或某种耐药模式,感染预防计划将不能发现严重问题,甚至是感染暴发。相反,感染预防人员也有可能因调查时的弄虚作假而分散、浪费宝贵资源。

实验室若发现商品化的自动药敏试验或鉴定系统存在问题,应提醒制造商关注,以改进仪器、试剂板条或软件程序,提高准确性。对自动化仪器的持续独立评估及向生产商的反馈十分重要。遗憾的是,在实验室资源不断缩小的时代,越来越少的实验室具有对新技术进行严格内部评估的能力。最重要的耐药出现于医院感染病原中,包括:产 ESBLs 和碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌[12,61]、耐糖肽类的肠球菌[62]和金黄色葡萄球菌[63-65]、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)[66]和多重耐药或泛耐药的非发酵菌(如铜绿假单胞菌、不动杆菌属、嗜麦芽窄食单胞菌)[9,11]。近来,质粒介导的多粘菌素(通常作为治疗多重耐药革兰阴性杆菌的最后一道防线)耐药已经出现并成为重大的公共卫生问题[67]。

感染预防计划必须落实措施以防止重要多重耐药菌(MDRO)传播。CDC 发表了一份全面的指南,以协助此方面的工作[68]。然而,任何控制多重耐药菌计划的成功与否都取决于实验室的检测能力。实验室主管需阅读当前有关自动化仪器检测新发耐药能力的文献,必要时采用额外的方法来检测或确认特定耐药模式。CDC 网站上总结了耐药性检测最新建议的说明表(http://www.cdc.gov/HAI/settings/lab/lab_settings.html)。本书第 75 章和第 79 章中也有介绍。

尽管基因分型表现出许多潜在的优势,但是在短期内仍不能完全取代临床实验室采用表型法来检测抗菌药物的耐药情况。分子方法检测耐药可直接应用于临床标本,可在检测和鉴定病原体同时识别耐药特征[69]。同样,分子方法有

助于检测病毒，缓慢生长或无法存活的微生物，或具有通过表型试验无法检测耐药机制的微生物（第 79 章）。然而，由于其高特异性，分子学方法不会检测到新出现的耐药机制，以及以前菌种内未被观察到的耐药基因。此外，耐药基因的存在并不意味着该基因进行表达，已知的耐药基因的缺失也不排除其他耐药机制的可能性[70]。药敏试验表型法使实验室对于许多微生物检测成为可能，同时还可以检测新出现及已明确的耐药模式。

（三）实验室信息系统

可前瞻性检索信息并关联其他电子病例的信息系统可帮助感染预防师进行感染监测、发现患者间病原传播并早期发现感染暴发[71-72]。因此，选择实验室信息系统（LIS）的人员在为医院选购信息系统前，需向实验室及感染预防人员进行咨询。

（四）用于感染预防和抗菌药物管理的快速诊断试验

过去 20 年内，众多利用分子或免疫方法的快速诊断试验得以开发。例如，一些方法可快速检测呼吸道病毒[73-74]、艰难梭菌[75]、结核分枝杆菌[76]和军团菌[77]。多重分子板条广泛用于从患者样本（"综合征"检测）中发现多种潜在病原微生物[74]；同时，重要抗菌药物耐药的快速分子检测[78-79]（第 7 章和第 72 章）。这些检测越快有结果，便可早期干预以改进感染预防效果（例如，早期采用适当隔离预防措施以防病原菌传播，或更迅速地调查医疗机构水源以控制军团菌播散）。

当然，如果医生盲目开具检查或实验室质控不佳，快速诊断测试会造成错误，包括假阳性结果导致患者接受不正确的治疗和隔离。错误结果也会使感染预防人员浪费时间去调查虚假的感染暴发[78]。

如前所述，病原体（及药敏）的更快速检测对良好的抗菌药物管理也非常重要。最近 Timbrook 等近期进行的荟萃分析表明对菌血症管理采取快送的分子检测方法与 30 天死亡率下降相关，快速检测与积极的抗菌药物管理计划相结合，可以减少 30 天死亡率并显著降低治疗费用[50]。病原体更快速的检测方法和耐药的决定因素在本书第 5 章和第 72～79 章进行讨论。

（五）向感染预防部门报告实验室数据

培养及药敏试验结果是感染预防的重要信息来源，感染预防师通常每日查看这些信息。因此，感染预防师应能方便获取常规微生物实验室检测结果。除了获得实时数据外，如本章前面所述，定期总结特定微生物学结果如医院感染病原的耐药谱，对临床医生和感染预防师都有益。这些信息将帮助临床医生为医院感染患者选取经验性抗感染治疗的药物，也会帮助感染预防计划监测因重要的多重耐药菌引起医院感染的比例。

实验室人员应通过电话方式将一些检测结果直接向感染预防师汇报，以保证恰当的控制措施得以实施。需要立即通知感染预防部门的微生物学结果包括：脑膜炎奈瑟菌、军团菌、抗酸阳性杆菌、肠道病原菌如沙门菌或志贺菌、多重耐药菌如耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌。除此以外，遇到新的、不常见的病原体或可疑生物恐怖病原菌（如炭疽杆菌、鼠疫杆菌、天花病毒），实验室应立即上报。每家医疗机构要求立即上报的微生物列表存在差异。例如，一种多重耐药菌已在一家医院流行，这时不需要立即报告，但如果在另一家医院尚未出现，则需要立即报告通知[33]。

除提供书面、电子和口头报告外，实验室人员应定期与感染预防工作人员碰头，保证交流直接、清晰。他们可以讨论共同关心的话题，如集聚或暴发的流行病学或微生物学调查情况，一起判定是否有必要进行补充检测，如分子分型或环境微生物培养。如果有必要进行补充检测，则需决定要做哪些检测、谁来操作、何时进行等。

（六）感染暴发的识别与调查：流行性与地方性感染

大多数医院感染与暴发无关，仅为地方性而非流行性感染。若将医院感染率通过前瞻性监测来进行统一定义，感染预防人员偶尔可通过分析感染率识别医院感染的暴发（即当某时期内感染率增加超过预期水平时）。然而，更多情况下，感染预防人员通过与病区、诊室或实验室的人员接触了解到可能存在的暴发。

当感染预防人员检测到医院感染出现集聚性

或暴发时，若感染病原不明，需迅速行动以确定病原体，确定暴发的范围、了解病原传播方式并实施合适的控制措施。此时临床微生物实验室需提供合适的实验室支持。表9-5列举了感染暴发调查时推荐的步骤，并指出临床微生物实验室在每一步中的重要作用。

表9-5 医院感染暴发的调查步骤和实验室的作用

调查步骤	临床微生物实验室的作用
识别问题	是筛查或早期警示系统、最好是实验室信息系统的一部分。将感染聚集、特殊耐药模式及疑似的患者间传播报告给感染控制人员
确定病例定义	为病例定义的实验室诊断标准提供帮助及建议
确认病例	进行诊断的实验室确认
完善病例信息	准确分析分离株的特征。保存所有无菌部位分离菌株及流行病学意义重要菌株。对新病例检索实验室数据库信息
确定基线感染率；与疑似暴发时罹患率进行比较	为进行中的调查提供数据，包括特定病区及感染部位的基线感染率。若未曾前瞻性监测基线感染率，则在实验室数据库中检索所有既往病例
暴发特征（描述性流行病学）	进行菌株分型，并与先前分离的地方性感染菌株比较，以确定暴发是否为同一菌株所致（第11章）。这一步只能对常规进行储存的病原体进行（见前述）
建立原因假设：来源、传播途径、传播媒介	在需要时提供补充的研究或培养，但仅在有合理流行病学联系提示存在工作人员、患者或环境间传播时
进行病例对照研究或队列研究	需要时进行补充研究
执行控制措施	若有必要，调整实验室流程
持续监测以记录控制措施有效性	维持实验室的监测及早期警示功能

如果感染预防计划团队提前做好准备，可以为暴发调查提供方便。这一过程中的一个步骤是确定在医院中发生的最常见的暴发类型（例如，外科ICU内的金黄色葡萄球菌伤口感染，或肾支持治疗病房的军团菌病），然后实验室和感染预防计划人员可以确定对于"典型"暴发来说需要哪些资源（例如，人员、时间、资金、物资、空间或特异的检测）。实验室人员应预测与暴发调查相关的额外费用，以便与医院管理人员商讨将工作的经费纳入年度预算。

感染暴发通常是在它们已经被解决或已经开始减弱时才被回顾性发现。因此，对临床微生物实验室来说，主要挑战在于尽早发现感染暴发，以便进行有效干预，降低发病率和死亡率。计算机决策支持有助于识别在同一时间，同一护理区发生相同微生物感染的聚集[72,79]，但暴发往往是由一线实验室人员最早发现，因此，实验室人员和感染预防计划人员之间有效与定期的沟通尤为关键。考虑到调查暴发的固有的压力和必须快速做出重要决定，包括实验室人员在内的感染预防计划团队可能需要每天开会讨论新发现并做出决定。

感染暴发调查中出现的一些问题、隐患与临床微生物实验室有关，值得关注。其中最重要的问题是确定何时开始调查。构成感染暴发所需的病例数量取决于病原体种类、患者人群和所涉及医疗机构。例如，即使长期护理院中发现多例大肠埃希菌尿路感染，可不构成感染暴发，但医疗机构内A组链球菌引起的手术伤口感染或是耐万古霉素金黄色葡萄球菌（VRSA）感染，即便仅有1例，也值得进行调查。另一个重要的问题是假性暴发。假性暴发是指表面上看似感染暴发，而最终确认并非暴发。常见的原因为诊断错误（如感染并未发生）或流行病学数据的错误解读（感染确有发生，但聚集或流行传播并不存在）。微生物实验室可能为假性暴发的源头[80-87]，可引起其发生的实验室问题包括：染色剂污染[82]、药敏试验结果错误[81]、培养标本污染（常因建筑或改建工程[84]或标本处理时的交叉污染[87]）。细致的质控工作、样本处理时的无菌技术、实验室建造或改建时采取的预防措施均可降低源自实验室的假性暴发。有关暴发的更多详细信息调查可在第10章中找到。

(七)支持感控活动的分子分型

在一些情况下,确定 2 个或 2 个以上的微生物是否存在遗传上的联系,从而可能有共同的来源是很重要的。这些情况包括:①暴发、聚集和其他传播调查,如需要患者间传播或感染的共同宿主的证据;②确定发病机制或个体感染的起源(例如,将从感染中分离的菌株与以前从患者或环境发现的定植菌株进行比较);③监测具有某种特殊毒力或流行性克隆的菌株的出现和传播(如 USA300 MRSA,BI/NAP 艰难梭菌)。在许多情况下,种水平的鉴定及药敏试验结果可为支持(或反对)存在流行病学关联提供证据。然而,因为许多病原体有可预测的耐药模式,药敏试验模式不足以识别,需要额外的测试来确定分离株之间是否真正相关联。因此,基因分型或基于 DNA 的分型方法已取代了菌株识别能力不佳的表型分型方法(如药敏试验、生化反应特征、噬菌体敏感谱)。考虑到对细菌或病毒基因组进行测序所需的成本和时间已经大幅减少,全基因组测序已成为与卫生保健相关的细菌性病原体分子分型的"金标准"[88]。

理想的基因型分型系统应标准化、可重复、稳定、敏感性高、适用范围广、容易获得、价格便宜,在既往流行病学调查中已证实有明确价值。分型方法相对优势、劣势的进一步讨论不在本章范围内,这些讨论在本书第 11 章中已有总结。

(八)生物标本库与存储

若合适的菌株未被保存,临床微生物实验室就不能为感染预防计划提供分子分型等补充检测。实验室应事先作规划,并确保所有流行病学意义重要菌株的保存(第 12 章)。实验室及感染预防人员应决定哪些菌株应保存,并根据其流行病学重要性、可用资源决定存储的时间长短。建议将所有来自正常无菌部位(如血液、脑脊液)菌株、所有部位分离的重要多重耐药菌(如 CRE)及其他流行病学意义重要病原菌(如结核分枝杆菌)保留 3～5 年。

(九)患者、医务人员及环境的监测培养

临床微生物实验室常常被要求去检测可能定植在患者、医务人员及医院环境的潜在病原菌。例如,尽管仍有争议,但是美国的一些州(包括退伍军人医保系统)已强制要求常规进行 MRSA 的"主动监测和隔离"(用培养或分子生物学方法确定无感染征象者是否存在 MRSA 定植,以进行接触隔离)[89]。随着 MRSA 主动监测的经验积累,有研究者对如何最好运用主动监测预防其他多重耐药菌,包括 VRE、MDR-GNRs(如碳青霉烯类耐药的肠杆菌)、艰难梭菌的传播产生兴趣[90]。

开始大规模主动监测工作前需要仔细考量,因为这些措施复杂且消耗大量资源。事实上,对不同多重耐药菌开展大量主动监测培养(需要从每位患者不同部位获得培养标本)的工作量将使临床微生物实验室、感染预防计划部门和医院病区不堪重负,实验室资源不合理消耗。此外,近年的研究显示,"水平"感染预防措施(针对所有感染类型、应用于全体人群的方法,如手卫生)优于"垂直"方法(针对某一病原菌的措施,如 MRSA 的主动监测)[91]。比如,最近一项群随机研究证实,相较主动监测,所有 ICU 患者的全面去定植对于降低血流感染率及 MRSA 阳性率更为有效[92]。同样,一项大型欧洲研究(13 个 ICU)发现,加强手卫生、氯己定擦洗后,即使采用针对 MRSA、VRE 和 MDR-GNR 的"主动监测和隔离"并没有减少这些多重耐药菌的分离率[93]。笔者认为,多重耐药菌的主动监测应限于以下范围:①新出现的棘手病原体;②采取标准化、强化感染预防措施后,多重耐药菌仍持续传播;③感染暴发。这些情况下,应将主动监测视为成熟的水平感染预防措施(例如,手卫生、氯己定坐浴擦浴和集束化措施以预防发生器械相关感染)的辅助,而非替代措施。另外任何主动监视的费用都应由医院承担,因为测试是用来指导感染预防工作,而不是通知患者进行治疗。

有时也对医务人员筛查,确定是否携带有流行病学意义重要微生物。最常见筛查的微生物为多重耐药菌,主要是 MRSA,通常作为感染暴发处置的一方面。其他微生物(如 A 组链球菌)的筛查也可作为医院感染或感染暴发调查的一部分。最后,手培养可用于教育目的,以支持手卫生运动或用于暴发调查中证实交叉感染的机制[94]。

对于 MRSA 等病原体,筛查方法已标准化且非常成熟,而其他病原体(如 MDR-GNR 等)的筛

查方法还在不断改进，并将随更复杂耐药表型的出现而继续改进[95-96]。表 9-6 罗列了目前筛查患者及医务人员是否携带流行病学意义重要微生物的方法。

表 9-6　无症状患者及医务人员中，具有流行病学意义的重要病原的携带者筛查[a]

病原体	诊断方法	TAT(h)	最佳标本
金黄色葡萄球菌，包括 MRSA	常规需氧培养及 AST	48～96[b]	鼻拭子[c] 咽部、肛周、皮肤、伤口
	显色琼脂培养基	18～48[d]	鼻拭子咽部、肛周、皮肤、伤口
	实时 PCR(MRSA)	1～4	鼻拭子[e]
万古霉素耐药肠球菌(VRE)	常规需氧培养及 AST	48～72	肛周或粪便拭子
	实时 PCR	1～4	肛周或粪便拭子
多重耐药革兰阴性杆菌(铜绿假单胞菌、不动杆菌属、嗜麦芽窄食单胞菌、产 ESBL 和产碳青霉烯酶微生物)	常规需氧培养及 AST[f]	48～72	肛周或粪便拭子、气管内或痰标本、既往感染或定植的部位[g]
	实时 PCR(碳青霉烯酶)	1～4	肛周或粪便拭子
A 组链球菌	常规需氧培养	24～48	肛周、阴道、皮肤及咽拭子
手部多种微生物	常规需氧培养	48～96	手部培养
	接触琼脂平板		直接印于琼脂平板上
	肉汤培养(手套浸泡方法)		手浸没并搅拌肉汤 1 min 后，对肉汤进行培养

注：[a]这些培养应只在以下情况时进行：①作为暴发调查的一部分，在与感染病例流行病学相关的患者或医务人员中寻找病原体携带者；②作为强化的 MDRO 控制策略之一，寻找携带者；③为降低易感期(如围手术期)金黄色葡萄球菌感染风险而识别携带者，以采取去定植措施。[b]“金标准”法包括隔夜肉汤增菌及菌株鉴定、药敏试验，可使 TAT 延迟至 96 h。多数不经肉汤增菌传统琼脂筛选(如带或不带苯唑西林的甘露醇盐琼脂)的 TATs 约 48 h。[c]鼻腔是单一部位采样检测金黄色葡萄球菌(包括 MRSA)敏感性、特异性最高的部位[108]。然而，一些研究显示，对额外的部位进行采样，(包括口咽部及直肠周围等)可使检出增加 10%～40%[108-110]。[d]产色琼脂培养基阳性结果可在 18～24 h 报告，但阴性结果需等待至 48 h。[e]目前可用的实时 PCR 检测中，美国 FDA 仅批准用于鼻拭子，但在一些研究中也用于口咽部、皮肤及直肠拭子。[f]一些培养的技术改进增加培养基对 MDROs 的选择，从而提高检出率(例如，为检出产 ESBL 肠杆菌科细菌、氟喹诺酮类耐药大肠埃希菌、耐碳青霉烯革兰阴性杆菌而分别添加头孢他啶、左氧氟沙星、亚胺培南或美罗培南等)。现在有许多商品化的显色培养基，CDC 已有关于耐碳青霉烯肠杆菌科细菌的检测指南(http://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/klebsiella_or_ecoli.pdf)。实验室为迅速检测特定耐药性基因(如 blaKPC)而开发的分子技术在一些中心已在使用中，用于检测多个耐药基因的多重分析正在商业开发中。[g]应由可能的携带部位决定采样部位，以胃肠道(如肠杆菌科细菌)及呼吸道(如不动杆菌)最为常见

暴发调查时，实验室及感染预防人员决定对医院工作人员采样培养前，应权衡以下 2 个重要因素：①在医务人员手部或鼻腔分离到致病菌，不能作为确定感染传播的方向或确认工作人员即为暴发源头或宿主的依据；②不加区分地对员工进行采样，可导致混乱结果，也可能使他们对感染预防工作产生憎恶情绪。总而言之，应只对流行病学上与病例相关的医务工作者进行采样。笔者建议，咨询了暴发调查经验丰富的医院流行病学家后，感染预防计划方可对医院员工进行采样。

医院环境一度被认为是医院感染病原体的主要来源。此后，人们意识到患者常常从自身定植菌群获得感染[97-98]。尽管如此，医院环境可作为这些定植菌群来源，通过衣物或医务人员双手传播[99]。因此，在某些特定情况下，有必要对环境采样以保证质量，或检测潜在病原体。用于质量监控的常规采样，应限于消毒灭菌过程的生物监测，以及血液透析用水及透析液的每月培养。偶尔也可用于短期评估医院清洁剂消毒有效性(例如，房间终末清洁后检测物体表面是否带有 VRE 或艰难梭菌，以评价清洁效果)。同样，诊断出医院内军团菌感染病例后，或是作为降低其风险的综合计划一部分，应对医院饮用水进行军团菌检测[98,100-101]。对高度免疫抑制患者，空气采样检测真菌孢子是识别真菌传播来源重要的一步。极少数情况下，若病原体的传播涉及无生命物体或表面，则有采样指征。表 9-7 列举了目前医院环境内，流行病学上重要微生物的筛查方法。重要的是，临床微生物实验室应对环境进行不定期测试，这种测试应由信誉良好且经过认证的环境测试实验室完成。

表 9-7 环境(空气、水、物体表面)微生物的筛查[a]

环境及病原	诊断方法	TAT	最佳标本
空气			
真菌	真菌培养	48 h～7 d	运用大容量空气采样仪处理的空气[b]
细菌[c]	常规需氧培养	48～72 h	运用大容量空气采样仪处理的空气沉降平皿
水			
军团菌	选择培养基培养[d]	5～10 d	500～1000 ml 水样[e] 水龙头、淋喷头、曝气器内表面拭子[e]
真菌[f]	真菌培养	48～96 h	500～1000 ml 水样[e] 水龙头、淋喷头、曝气器内表面拭子[e]
细菌	常规需氧培养	48～72 h	依据 AAMI 标准的水及透析液样本[g]
物体表面			
需氧菌(包括多重耐药菌)	常规需氧培养	48～72 h	物体表面拭子或海绵[h],接触琼脂平板(Rodac)
艰难梭菌	厌氧培养	48～72 h	物体表面拭子或海绵[h],接触琼脂平板(Rodac)[i]

注:[a]除对血液透析的水和透析液进行培养,以及饮用水培养进行军团菌监测外,只有在流行病学调查提出病原传播环节可能涉及环境时,才对环境进行培养。[b]采集真菌孢子时,首选大容量的空气采样仪,而非选用沉降皿。[c]空气样本中没有可接受细菌量的标准,也无任何证据表明细菌量与感染风险相关。空气采样监测细菌,应仅在极少数情况下、作为感染暴发调查或科学研究方案的一部分进行。[d]军团菌在常规需氧培养皿上不生长。缓冲炭酵母提取物琼脂(BCYE)是分离军团菌最常用培养基。[e]首选大量水样(1 L)。若水源含氯,每升样本中应加入 0.5 ml 的 0.05 mol/L 硫代硫酸钠以中和其中的氯。水样通过滤器浓缩。采样过程中拭子应浸在同一部位 3～5 ml 的水样中防止干燥。[f]医院环境中水源传播真菌在感染传播中作用不详,但在免疫抑制宿主发生侵袭性真菌感染暴发时,培养是寻求环境来源的一部分内容。[g]医疗器械促进协会(AAMI)标准负责管理血液透析的微生物学监测。[h]采样前应湿润无菌拭子或海绵(如使用营养肉汤、无菌生理盐水等)。[i]对于艰难梭菌,接触琼脂平板应先进行预还原(选择性、预还原介质,及时置入厌氧环境)

总体原则是,不应对医护人员或医院环境进行常规、无针对性的培养。因为会消耗大量人力,非标准化,难以解释结果,且很少提供有用信息[98]。除此前列举情况外,采样应在向医院流行病学家咨询后,仅作为流行病学调查的一部分开展。当流行病学调查在患者和(或)环境标本中发现共同病原体后,实验室还应如前所述进行流行病学分型。

(十)医疗保健感染预防的新问题与趋势

医院感染预防格局在不断变化。在过去十年中,新的重要问题(至少在美国的医疗系统中)包括:①人们日益意识到每种医院感染都可预防,因此,可接受的医院感染率为零;②由于透明度与医院感染导致财务负担的增加,医疗机构为展示医院感染已被消除,其压力显著增加[36];③在医院感染风险中,人类微生物组及其作用的重要性日益受到重视。这些趋势同时为临床微生物实验室带来挑战与机遇。

采用当前最佳临床实践时,许多医院感染可以避免,但仍存在许多认知不足,并导致对于需要破坏宿主防御的侵袭性操作的严重免疫缺陷的患者仍存在医院感染风险[36,102]。然而,改进的预防方法使得医院感染比预想中更进一步降低[24]。随着医院感染率越来越低,每一例医院感染都经过仔细审查。在一些机构中,医院感染可能受到评审委员会或临床医生的判定[103]。对于包括将临床微生物实验室检测结果作为定义的一部分的医院感染来说,这种审查增加了那些诊断测试的压力,以提供不现实的准确性水平。例如,一个机构越成功地降低其与卫生保健相关的艰难梭菌感染率,就越有可能从一个高度敏感的基于 PCR 的检测中得出阳性结果,从而得出假阳性结果。这就需强调严格标本送检的重要性(如不检测非腹泻的粪便、不重复检测、不为验证疗效检测),同时这也明确了没有一家机构会证明"消除"了医院艰难梭菌感染,只要是某些假阳性结果就无疑会导致错误分类。同样的概念也适用于高度依赖微生物学结果的医院感染的所有定义。随着每一例医院感染的风险增加,实验室即便不参与各例医院感染的裁定,无疑也会被要求为其诊断方法准确性辩护[35]。CDC 的医院感染控制实践顾问委员会(HICPAC)最近发布了这一新型高风险环境中使用监测数据的指南[36]。

与此同时，人类微生物组在医院感染风险和预防中的作用也越来越受到关注，一个重要的例子是肠道微生物组破坏与CDI及多重耐药菌携带之间存在关联性[105-106]。以下有几种通过影响病人微生物组以达到降低医院感染风险的方法，如氯己定擦浴或口腔护理，抑制某些方面的皮肤或黏膜正常菌群或粪便微生物群异位，来治疗复发性CDI或消除多重耐药菌定植[105,107]。随着我们对人类微生物组在医院感染风险和预防中的作用认识的不断加深，以及对微生物评估有巨大作用的宏基因组研究方面的进展，实验室最终可能需要提供比临床样本中是否存在已知病原体更多的信息。这项技术和转化为临床应用还需要进一步的发展，但不难想象，未来临床实验室将可以对患者不同的身体部位的微生物菌群进行快速和详细的评估，以帮助指导医院感染的风险评估并提供预防措施。

这种高风险的医院感染预防环境和快速发展的技术的结合为临床微生物实验室在医院感染预防中发挥更积极的作用提供了令人兴奋的机会。一旦卫生保健系统的领导人认识到临床微生物实验室是任何有效的感染预防计划的组成部分，他们就会明白削减临床微生物实验室的资源是多么短视。虽然这种削减可能在短期内节省资金，但它们无疑将增加长期成本，更重要的是，由于临床微生物实验室对知识产权活动的支持不足，与HAI发病率升高和疫情失控相关的发病率和死亡率也将增加。

高风险医院感染防护环境与快速进展的检验技术的结合为临床微生物实验室创造了在医院感染预防中扮演更积极角色的机会。一旦医疗系统领导者意识到临床微生物实验室是各种有效感染预防计划的有机组成部分，他们就会明白削减临床微生物实验室预算是一种短视行为。削减预算短期内似乎省钱，但无疑将增加长期开支。更重要的是，临床微生物实验室对感染预防工作的支持不足将导致医院感染率、病死率及未控制的感染暴发增加。

四、结论

临床微生物实验室是每一家医疗机构感染预防计划的重要组成部分，在感染监测、发现与处置感染暴发、抗菌药物管理、风险评估与规划、宣传教育等方面均扮演重要角色。实验室新技术的开发和应用可以极大地促进感染预防工作。为保证最优化医院感染预防、节约经费并拯救生命，需要临床微生物实验室与感染预防人员密切合作。

参考文献请扫二维码查阅

第10章　疾病暴发调查

IONA MUNJAL, WENDY A. SZYMCZAK, BELINDA OSTROWSKY

（孙宏莉　译；王辉　审校）

一、简介/定义

疾病暴发（或聚集性事件）是指一个疾病的发生例数超出了预期数量。无论暴发发生在局部地区还是导致大范围传播，均会对医疗保健支出产生重要影响。暴发时间可能很短，也可能持续数年。对暴发进行分类，关键是要了解其感染因子的流行病学。单一一个病例出现在某一不为人知的地域或社区，如天花，即可视为疾病的暴发并应启动调查。无论病例数是几个还是发展至成百上千，疾病暴发都会引发大范围人群的恐慌和焦虑，并耗费大量的公共资源[1]。

相对于持续的疾病发展，很难识别病例数量的增长是否与当时正发展的疾病有关。通过对暴发时间、地点和人员的记述而增加病例定义的特异性，可以最小化此难题。这包括收集集群性病例之间相似性及确定重要的离群值等详细信息。在传统意义上，地域性是暴发溯源的一个主要线索。然而，由于经济的全球化、旅行与贸易的日益增加，致病菌传播已超越了典型的地域范围。现在人们和食物常会定期地远距离旅行，这打破了感染源原有的地理界限。公共卫生官员必须具备知识和灵活性，以应对疾病在一些非常规地点的出现，并且有能力在洲际对病原体进行溯源。当今世界很容易看到某种疾病暴发是如何演变成为大范围流行蔓延到多个国家的，即使病例数不多。

当人群赴感染高发区旅游或新的感染性疾病被引入易感染人群时，通常可激起暴发，如发生寨卡病毒疾病，至少从1947年以来，这种病毒一直在非洲和亚洲地区流行，但并未在这些地区的当地居民中引起临床上的重大疾病[2]。然而，2007年雅浦群岛（Yap）的一群无免疫性人群获得该病毒后，大约73%的人口感染了病毒，并出现许多皮疹、发热、结膜炎和关节痛等症状[3]。2013年在法属的波利尼西亚暴发及2015年在巴西首次发现后发生的持续性全球暴发[4]。出现了更严重的疾病表现如吉兰-巴雷综合征（Guillain-Barré syndrome）和婴儿宫内暴露寨卡病毒的小头畸形（microcephaly in infants），在现行暴发期间，病毒因素和宿主免疫状态很可能影响了所观察到的新发疾病的结局。研究表明，流行的寨卡病毒株中的突变可引起小鼠胎儿明显的小头畸形[5]。此外，来源于以前感染寨卡病毒或暴露于其他黄病毒的抗体可以起到保护或增强新获寨卡病毒感染病的作用[6-7]。

由于对感染性疾病的发病机制、微生物鉴定和菌株分型有了更多的认识，现代暴发应对的方法与前些年有很大不同。这些进步增加了在暴发时明确传染源的可能性。在过去的几年中，人类面临着许多挑战，包括有史以来最大的埃博拉疫情暴发。人类还继续面临新的挑战，如对多重耐药、高传播性酵母耳念珠菌，以及对大多数或所有可用抗菌药物具有耐药性的革兰阴性菌。快速准确地识别这些新兴病原体对于限制暴发扩散至关重要。

本章主要综述感染性疾病暴发的概念，包括疾病监测、用于检测暴发的机制，以及用于调查暴发的流行病学步骤。由于本书主要是为实验室人员而准备，因此，本章介绍了实验室在暴发中的作用，并举例说明了实验室检测在暴发调查中起关键作用。

二、疾病监测

暴发（或者流行）的情报收集是对可能代表威

胁公共健康的信号进行检测、验证、分析、评估和调查的过程[8]。在世界范围内，这些情报成果由国际卫生机构通过从各国公共卫生机构获得的信息协调完成，也需要地方权威机构参与合作。在大规模的全球流行病中，不断改进的协作是非常有效和必要的。比较 20 世纪最大规模的世界性流感和 21 世纪首次大流行，两者接触感染个体后产生的次生病例的平均数量——“R”是相似的[9-10]。然而，1918 年世界性流感影响了几乎 5 亿人口，并且造成 3% 的世界人口死亡，而 SARS 的流行只影响了不足 1 万人，这要感谢世界各公共卫生机构的合作应对（http://www.who.int/csr/sars/country/table2004_04_21/en/）。

在每一个层面，多学科合作团队都是由流行病学家、实验室人员、环境学家和其他技术人员组成。表 10-1 阐述了美国不同专业及各级机构紧密合作应对传染病的大暴发。大多数调查和进行这些调查的大多数法律权限在州或者地方级别进行。对抽样人群进行基础的实验室检测和访视，可以提供足够的信息以确定传染源并采取适当措施。这是地方当局权力管辖范围，通常可以与公众合作，不需要公共卫生机构授权。暴发研究为地方当局提供了一个增强教育水平和警惕性的独特机会，使他们对自己的地区有深入了解。

表 10-1　参与应对暴发的核心机构

需要应对的级别	所涉机构举例[a]
当地：涉及某一城市或乡村的事件	公共和私人机构的卫生保健供给者和当地实验室，包括城市和县的卫生部门
州：跨越多个城市或乡村的事件	州卫生部门和州级别的私人机构
联邦：大数量民众感染或者特大传播性的暴发	全国私人机构或者国家公共机构，如疾病控制中心、联邦药品管理局、美国农业部或美国卫生部
国际性：全球暴发的准备和应对	WHO

注：[a] 可通过以下网站获得更多信息：http://www.cdc.gov，http://www.fda.gov，http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome，http://www.hhs.gov 和 http://www.who.int/en/

只有当大暴发涉及多州，需要多机构协作或者要求特殊专家参与时，通常联邦机构才会介入。在美国，有各种联邦机构协助设置标准和协调工作，包括疾病预防控制中心（the Centers for Disease Prevention and Control，CDC）、美国食品和药品监督管理局（the Food and Drug Administration，FDA）、美国农业部（U. S. Department of Agriculture，USDA）和美国卫生部（U. S. Department of Health and Human Services，HHS）。例如，CDC 定期从全国 50 个州、5 个地区、纽约市和哥伦比亚特区的卫生部门收集监测数据。通常，这些数据报告是通过国家电子疾病监控系统（NEDSS）来完成。国家和地区流行病学委员会和 CDC 每年都会更新国家法定报告的疾病清单，表 10-2 包含了更新的版本（https://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/notifiable/2017/）。国家数据源可用于识别病例数或分布变化的异常数据（spikes），而在各个州级别可能会错过这些异常数据。例如，2011 年，美国的麻疹病例数增加到 222 例，发生 17 次暴发，这和 2001—2010 年期间的平均每年 60 个病例和 4 次暴发相比，发生了很大的变化[11]。尽管这些病例仅来自 31 个州，但是这些增加可以通过指定实验室的法定报告和临床诊断确定。

在国际上，世界卫生组织（WHO）设有 24 h 全球警报和反应系统，以应对流行病和紧急健康事件，并汇集现存的顶尖专业实体资源库支持成员国进行应对流行病的准备工作。WHO 发布的《国际卫生条例（2005）》，为成员国发展和保持监测能力提供了气候框架，在此框架下，任何成员国获知暴发了全球关注的疾病，都有义务在 24 h 之内向 WHO 报告（http://www.who.int/ihr/global_alert/en/）。然后，由更大的国际性机构向地区性机构收集和传播信息，使他们时刻保持在全球视野之中。例如，巴西 2015 年寨卡病例的增加促使泛美卫生组织（Pan American Health Organization，PAHO）和 WHO 发布有关监测的建议和限制传播的措施，并确定研究重点。此外，PAHO/WHO 开始发布每周情况报告、每月区域流行病学报告及累计病例数，以便卫生专业人员和公众了解情况（http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11585:zika-virus-infection&Itemid=41688=en）。

表 10-2 国家层面关注的法定感染病[a]

炭疽	脑膜炎球菌病
虫媒病，神经侵袭性和非神经侵袭性	腮腺炎
巴贝虫病	新型甲型流感病毒感染
肉毒毒素中毒(食源性，婴儿和其他)	百日咳
布鲁菌病	鼠疫
软下疳	脊髓灰质炎病毒感染
沙眼衣原体感染	鹦鹉热
霍乱	Q 热
球孢子菌病	狂犬病，动物和人类
先天性梅毒	风疹
隐孢子虫病	沙门菌病
环孢子虫病	严重急性呼吸综合征相关的冠状病毒(SARS 冠状病毒)
登革病毒感染	产志贺毒素大肠埃希菌(STEC)
白喉	志贺痢疾
埃里希体病/无形体病	天花
贾第虫病	斑点热立克次体病
淋病	链球菌中毒性休克综合征
流感嗜血杆菌，侵袭性疾病	肺炎链球菌，侵袭性
麻风病(Hansen's disease)	梅毒
汉坦病毒感染	破伤风
溶血性尿毒症综合征，腹泻后	中毒性休克综合征(非链球菌)
肝炎，病毒	旋毛虫病
甲型肝炎，急性	结核病
乙型肝炎，急性，慢性或围生期感染	土拉热病
丙型肝炎，急性、慢性	伤寒
人免疫缺陷病毒(HIV)感染	万古霉素中介的金黄色葡萄球菌(VISA)感染
流感相关的儿科死亡率	万古霉素耐药的金黄色葡萄球菌(VRSA)感染
军团菌病	水痘
钩端螺旋体病	弧菌病
李斯特菌病	病毒性出血热
莱姆病	黄热病
疟疾	寨卡病毒病和感染
麻疹	

注：[a] 改编自 https://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/notifiable/2017/infectious-diseases/

三、暴发检测

启动暴发的调查具有很多原因，但总体而言，潜在暴发是通过下面 3 种方式之一引起卫生当局关注：直接报告、主动病原体监测和症状监测。

直接报告是指当公众将病例通知卫生机构，此机构通过通知或投诉系统的方式获得实时信息。自公共卫生机构建立之初，采用通知的报告方式对鉴定疾病的暴发一直很重要。通常情况下，个人会打电话报告疾病，这种情况或许发生在群体活动或事件之后。负责的医生也可能会上报一个或者更多案例。关于暴发的最初认识通常始于机敏的临床医生将某一特定的临床表现与其可能与更大的暴发事件相关的可能性之间建立联系，尤其是在遇到多个具有相同表现的患者时。例如，据报道，密苏里州和伊利诺伊州 2 家儿童医院的严重呼吸系统疾病患者人数增加，从而确定了 2014 年的肠道病毒 D68 的暴发。肠道病毒/鼻病毒 PCR 阳性结果的报道也有所增加，并且在 CDC 进行的进一步测试证实了病原体是肠道病毒 D68[12]。通过直接报告，可以及时发现由任何微生物引起的病例，而不仅是那些被主动监测的微生物。然而，基于被动通知的系统(第 11 版：以通知为基础的系统)依靠优质资源以适当地分流和研究这些报告。

积极的病原体监测需要常规报告特定的状况和疾病。每个州和地方均制定了特定传染病列

表，需要将这些传染病报告给地方卫生部门以进行主动监测。大多数州都要求实验室和临床医生进行双重报告，以确保不会漏诊病例，并允许当地卫生部门获得完整的实验室和临床信息，这些信息对后续调查必不可少。有关部门要定期进行特定病原体的监测，以发现聚集性病例或从未见过的、超过该地区以前预定义的病例数。正在进行的流行病学数据收集可以设置警报和响应阈值。

由于预定义的报告清单可能会忽略无法识别或新现的病原体，所以强制报告中要包括这样的语言，即任何"罕见的聚集"或者"可能产生某些无法预期的临床意义的病原体"。此外，卫生部门和CDC将提供实时健康警报，以提示一新发病原体或某个与暴发有关的微生物是否应该报告、是否应进行其他检测。例如，从宾夕法尼亚州的1例患者尿中分离出一株带有*mcr-1*基因质粒的大肠埃希菌，该基因介导多黏菌素耐药。这促使CDC提出了健康意见，因为多黏菌素是仅有的几种可以用于治疗多重耐药的革兰阴性菌的抗菌药物之一。该意见建议向当地卫生部门报告多黏菌素MIC≥4 μg/ml的肠杆菌科细菌（不是固有耐药性），并测试该基因的存在（https://emergency.cdc.gov/han/han00390.asp）。同样，CDC健康警报要求向公共卫生部门报告和提供耳念珠菌分离株。耳念珠菌株测序表明，遗传上不同的菌株已引入美国地区，而不止是一种优势菌株的出现和传播[13]。

最后，公共卫生部门可通过审视非特异性健康指标，积极进行症状监测。这方面的一个例子是CDC的做法：他们在重大事件（如奥林匹克运动会）时，到所有急诊科察看诊断代码，这使流行病学家能发现人为蓄意制造的食物中毒或者生物恐怖事件[14]。通过任何一种方式收集到的证据都可能包含假阳性信息，并且在设定需采取行动的上报阈值时，病例的定义变得至关重要。

四、调查暴发的流行病学方法

一旦发生疑似暴发，就可决定是否启动全面调查。暴发调查的原因可以有多种，包括（但不限于）以下方面：鉴定责任病原体、寻找感染源、确定具体的发病率、提出预防进一步传播的推荐意见。速度和准确性是2个必须考虑的关键要素。一个系统性的框架确保调查不顾此失彼非常重要。暴发调查的基本步骤如表10-3所示（https://www.cdc.gov/ophss/csels/dsepd/ss1978/lesson6/section2.html）[15]。这些步骤作为指南使得调查行动具有组织性、系统性和计划性。在暴发调查的紧急状态，这些步骤中的很多项目可以同时进行或重新排序，但是绝不能被忽视，并且应该形成一个自评清单。调查的广度和深度可根据以下情况而改变：资源、时间、暴发的临床或公共卫生意义或暴发是否正在进行中。

表10-3　暴发调查的步骤

1. 调查的准备
确定团队，阅读文献，通知合适团体，决定是否需要立即采取控制措施
2. 确认诊断
确定病例是"真实的"
排除假暴发
比较暴发前和暴发时的速率
3. 建立病例定义
建立选择患者的标准
4. 寻找病例
寻找病例并定义范围
5. 对流行病进行描述
对数据就时间、地点和人进行描述和定位
建立一份清单和流行曲线图
6. 提出假设
确定暴发是如何发生的，为什么会暴发
7. 评估假设
通过队列研究或病例-对照研究比较危险因素
8. 重新审视假设并继续补充研究
执行环境培养监测
进行分离株分型
9. 补充控制和防御措施
建立未来防御的对策
10. 互相交流发现的数据
对公共卫生人员和整个社区进行教育

根据暴发的性质，应该将该领域内知识渊博的专家团队聚集在一起。为了验证正在发生暴发，观察到的病例数必须超过预期数量。临床上相似却是不同疾病的无关病例，以及是同样疾病却为偶发或不相关病例，都可能混淆调查，必须予以剔除。确诊必须通过测试或者通过收集实验室标本，以便在随后的时间点分析（前提是病原体未知）来证实。应建立初始病例的定义，这涉及把病例分为：①确认的（confirmed），即实验

室检测阳性；②可能的（probable），即具备一些临床特征，但未经实验室确认；③可疑的（suspected），即只显示部分临床特征。这考虑到准确的病例计数，也考虑到病例定义和诊断方面的一些更新。

调查暴发的下一步是进行一些简单的流行病学分析。所涉及的卫生官员将建立病例清单，如一些早期人口学因素、潜在的暴露，以此鉴别出那些感染的和可能的感染源，或可能导致疾病暴发的暴露源，或至少与源头相关。在这一阶段，建立一个统计学直方图很重要，此图代表了随时间推移而发生的病例数量变化，以此来识别在风险暴露下暴发是如何蔓延的。点源式暴发是围绕着风险暴露的时间段产生的一群病例，这种人-人传播的特点是：围绕着风险暴露（原始病例）出现聚集病例，然后在暴露蔓延时发生次级二代病例（如家庭接触、学校接触等）（图 10-1）。

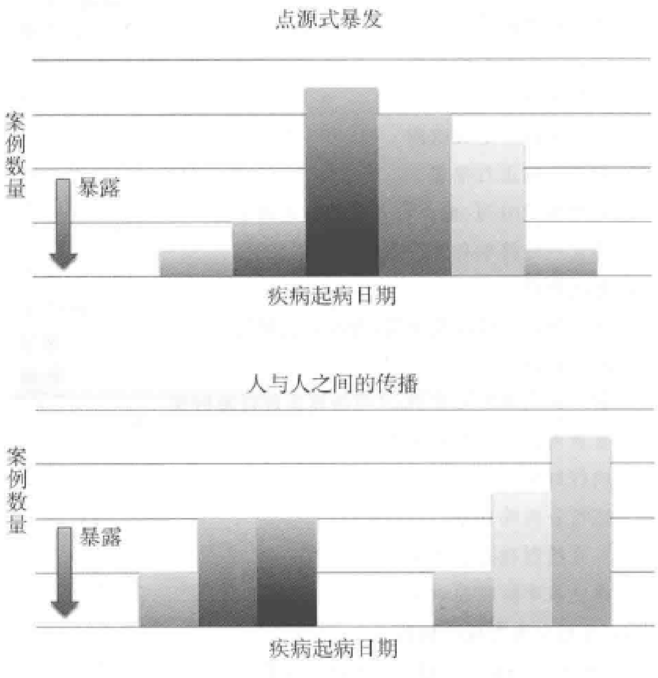


图 10-1 流行曲线。x 轴是时间；y 轴是案例数。2 条曲线对比了从点源暴发到人与人之间的传播的病例分布情况

重要的是，随着病例被识别出来，应当持续收集实验室的数据（包括传播尚未知时非初次收集的所有额外标本）。建议尽早提出原发病原菌的假设，但当信息确凿时，要修改这些假设。假设的内容应当包括传播的方式和可能的暴露机制。

一旦提出假设，需要一些防控措施以应对暴发。这些措施可能要修订，且如果需要应该成为较持久存在的措施，以保护易感人群，或者防范复发或类似暴发的发生。调查不应该随暴发的终止而结束。必须持续进行监测，以保证不再有与其相关的或超出该病正常阈值的新病例的出现。既定控制措施的有效性取决于公众的遵守情况。通过有效的沟通和教育，卫生官员可以确保新举措的依从性。WHO 发布了暴发期间公众应遵守的指南，但更多的沟通是由有实践经验的当地卫生部门进行（http://www.who.int/csr/resources/publications/WHO_CDS_2005_28en.pdf）。暴发之后可能还需要加强监测，并需要将更为持久的主动监测举措落到实处。

在一些暴发中，可以考虑进行额外的、更先进的、流行病学的、可比对的研究或其他研究（例如，病例对照研究、队列研究、实践观察）。可能适宜的情况包括：资源允许、暴发引起高死亡率或严重疾病、新的或异常病原、或新的传播方式和（或）执行控制措施但暴发仍然继续时。对这些更先进的研究的讨论不在本章编写范围之内，但可以在 Gordis 所写的《流行病学》中查到[16]。

五、实验室在暴发中的作用

（一）常规暴发反应

实验室对暴发的准备是具有挑战性的，因为暴发可能由各种病原体引起。但是，必须建立研究方案，细化针对可能引起暴发的病原体的反应措施。必须定期进行风险评估，以评估传染源在将要执行的诊断程序方面的潜在危害、进行检测时暴露（exposure）的可能性及暴露的后果。实验室团队应尽力预测暴发调查所需的样本和收集、处理及标本运输的需求。暴发将对实验室造成额外的需求，因此，必须尽早与实验室沟通，以便获得适当数量的测试耗材，并可以根据需要安排更多人员。如果医院实验室无法对可疑病原体进行检测，则可能需要与当地卫生部门联系，以便安排检测。实验室应做好准备，为标本采集提供临床指导，随着获得更多有关传染病的信息，该指导可能会不断发展。

在疾病的急性期获取标本时，最好在未进行任何治疗（如抗生素）之前，这样更容易检测到致病原。所有标本都应正确标记至少 2 个患者标识符，标本采集部位及采集日期和时间。此外，若是

疑有生物恐怖危害，需要将标本维持在监管链上(chain of custody)。CDC和WHO出台了总则和特定疾病的标本采集指南，表10-4中对此进行了修改(http://www.who.int/ihr/publications/WHO_CDS_CSR_EDC_2000_4/en/)。一旦疾病被确诊，标本采集就可局限于那些能确定疾病的部位。怀疑暴发时，实验室应保留残留标本，以防需要额外的检测。

表10-4 特异的暴发综合征的实验室研究[a]

综合征	建议的实验室标本	建议的实验室检测
急性腹泻综合征	粪便	粪便培养、毒素测定、血清分型、病毒培养，抗原检测、寄生虫大体和显微镜检查、多重PCR
急性出血热综合征	血清、尸体组织标本	病毒培养、抗原检测、抗体水平、尸检组织标本病理
急性黄疸综合征	血清、尿、尸体肝活组织检查	病毒培养、抗原检测、抗体水平、钩端螺旋体培养和血清分型
急性神经系统综合征	脑脊液、血清、咽喉拭子	病毒培养、细菌培养及药敏试验、抗原检测、血清分型、抗体水平、PCR
急性呼吸道综合征	血清、咽拭子、鼻咽拭子、痰、血培养、尿	病毒培养、细菌培养及药敏试验、抗原检测、抗体水平、血清分型、PCR
急性皮肤病综合征	水疱液/刮液、血清	病毒培养、细菌培养、抗原检测、抗体水平、PCR
急性眼科综合征	结膜拭子、喉拭子、血清	病毒培养、细菌培养、抗原检测、抗体水平、PCR
急性"系统性"综合征	血清、血液培养、尿、腹水和脑脊液(如果存在脑膜征)进行分析和培养	病毒培养、细菌培养、抗原检测、抗体水平、血清分型、PCR、血涂片(用于寄生虫)

注：[a] 改编自WHO暴发现场调查期间收集临床标本的准则(http://www.who.int/ihr/publications/WHO_CDS_CSR_EDC_2000_4/en/)

(二)应对由高风险病原(high-consequence)引起的疾病暴发

从2013年12月开始至2016年4月结束的史上最大规模的埃博拉疫情暴发，促使全美范围内建立了更多医疗设施，以照顾疑似或确诊的埃博拉病毒病患者。由于加强了防护级别，如限制进入、负压、单独的排气和过滤及用于废物灭菌的高压灭菌器，这些设施有潜力用于处理其他具有很高传播性和致死性风险的病原体引起的感染。必须评估在这些设施中要处理的感染类型，因为这将影响病房的设计或改装，以及个人防护设备的选择。例如，针对埃博拉病毒病选择的个人防护设备可能不足以处理通过呼吸道传播的疾病，如中东呼吸综合征的患者。必须制定手册，详细说明何时及如何激活受累单元，以及如何为其配备适当的工作人员。激活该单元的决定可在当地卫生部门的指导下，由收治医院的临床医生之间共同决定。文献描述了设施设计的关键方面，以及从隔离病房的患者管理中获得的经验教训[17-18]。

对患者的诊断检测可以在床旁或在单元内的实验室进行。实验室检测应仅限于有助于诊断高风险病原的检测，可以建立替代诊断的检测及对正在进行的临床护理至关重要的检测。CDC指南指出，对于检测可能患有埃博拉病毒病患者的实验室，实验室应能够提供基础代谢、肝功能、凝血、全血细胞计数、尿分析、血培养、流感和疟疾检测(https://www.cdc.gov/vhf/ebola/healthcare-us/laboratories/safe-specimen-management.html)。能够放置在生物安全柜中的小型仪器有助于最大限度地降低风险，但重要的是不要干扰柜内的气流。如果要在核心实验室或中心实验室中进行任何测试，则在离开样品室之前必须对样品容器进行适当的消毒处理。

由于缺少FDA批准的检测方法，因此，对高风险性、新发病原体的诊断测试的实施可能会变得很复杂。在这些情况下，实验室面临快速验证实验室开发的测试或在实验室合格的情况下执行已获得FDA紧急使用授权的测试的挑战。由于各个国家有其具体的有关样品所有权，数据所有权和人类受试者同意的法规，并且可能无法定义复杂的方案，因此制造商在开发和评估新的检测方法时也面临挑战。此外，由于不存在"金标准"的参考方法，因此，针对新检测法进行临床验证的

需求是缺失的。文献已经提出了对于评估暴发检测的全球应急标准的需求[19]。

(三)实验室检测方法

这些鉴定病原的现代技术已整合成为监测活动和散发病例调查的一部分,这些技术加快了暴发调查的实施速度。一旦确定暴发病因,焦点可以从病原的检测转移到干预。医疗资源可以直接转向治疗,如抗菌药物、治疗用抗体和疫苗等。如此,人们急切需要迅速而准确的病原检测方法。表 10-5 总结了一些在特定暴发中使用实验室的例子[20-22]。分子技术将在第 11 章中详细讨论,下面讨论基于核酸和蛋白质组学的检测方法的一些示例及其在暴发调查中的用途。

表 10-5 用于重要病原体暴发的实验室技术和控制干预措施的应用实例

参考文献	病原体	地点;病例数	传染源	实验室技术[a]	控制措施
细菌	弧菌				
WHO[b]	O1 群霍乱弧菌	也门;777 229 例(持续更新)	污染的饮用水	快速抗原检测,培养,血清分组	净化水源,治疗设施,教育运动,接种疫苗
20,21	A 群脑膜炎奈瑟菌	西非(主要是尼日利亚和尼泊尔);88 199 例	人-人传播	CSF 培养和药敏试验,PCR,血清分群,用于菌种鉴定的多位点序列分型	隔离病房,暴露后预防,免疫接种,包括引入新的 A 群联合疫苗
病毒					
WHO[c] PAHO[d]	寨卡病毒	在世界范围内,主要是巴西、安第斯地区、加勒比海;808 245 例	埃及伊蚊(白纹伊蚊,潜在媒介)	RT-PCR,血清学,谱系研究测序	病媒控制、旅行警示、教育运动
22[e]	埃博拉病毒	西非,主要是塞拉利昂、利比里亚、几内亚;28 712 例	人-人传播(怀疑蝙蝠储藏该病毒和人畜共患病暴露)	RT-PCR,谱系研究测序	病例管理,隔离病房,感染控制力度,安全的丧葬习惯
CDC[f]	基孔肯雅病毒	加勒比、中美洲和南美洲;>795 000 例	蚊子(埃及伊蚊,白纹伊蚊)	RT-PCR,血清学,谱系研究测序	病媒控制,教育运动
寄生虫					
CDC[g]	环孢子虫	美国,631 例	包装的沙拉	改良抗酸染色和 PCR 方法检测大便	暂时中止墨西哥泰勒农场的沙拉生产

[a] CSF. 脑脊液;RT-PCR. 逆转录 PCR。[b] WHO. World Health Organization;http://www.emro.who.int/yem/yemeninfocus/situation-reports.html。[c] WHO. http://www.who.int/emergencies/zika-virus/response/en/。[d] PAHO. Pan-American Health Organization.http://www.paho.org/hq/index.php? option=com_content&view=article&id=12390&Itemid=42090=en。[e] http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ebola-virus-disease。[f] https://www.cdc.gov/media/releases/2014/p1106-chikungunya-outbreak.html。[g] http://www.cdc.gov/parasites/cyclosporiasis/outbreaks/investigation-2013.html

许多临床实验室已经引入了基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS),可以快速准确地鉴定微生物,其中有一些不能通过生物化学方法鉴定。例如,MALDI-TOF MS 可以用于识别耳念珠菌,而基于生物化学的系统会鉴定错误[23]。MALDI-TOF MS 也已成功用于暴发调查期间菌株的分型,但该方法缺乏分辨率,这是因为在有限质量或电荷范围内只有丰度最高的蛋白质才被检测出来[24-25]。另外,如果调查中纳入以前暴发分离株,则质谱图会因某些原因出现变异(分离株生长条件不同、仪器性能随时间而变化,以及实验室间仪器配置不同),这可能导致需要对菌株重新进行分析[26]。

一旦核酸序列已知,通常通过 PCR 技术,将靶物扩增,就可用作检测方法。2012 年新冠状病毒(CoV)暴发时,CDC 开发了一种新的 PCR 试验,该方法在符合临床诊断标准的患者的呼吸道标本中,定量检测出中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)的 RNA[27]。对于检测已知序列的病原而言,典型的 PCR 有高度的敏感性和特异性,但需要依赖足够量的标本,以及与疾病表现有关的采集时间。对于中东呼吸道综合征-冠状病毒,需要多个标本(下呼吸道、上呼吸道、粪便和血清)以增加 PCR 诊断的可能性。

为了同时检测多种病原，可使用多重 PCR[28]。尤其在暴发中，当患者的主诉无特异性时，使用该技术最合适，它可缩窄鉴别范围(如常见呼吸道病原菌有呼吸道菌群组合、胃肠道病有胃肠道菌群组合等)。这些方法能够用于检测保健机构中的基线值和暴发聚集值，尤其是具有更为特异的检测平台时[如呼吸道合胞病毒 A(RSVA)与呼吸道合胞病毒 B(RSVB)]。

基因组测序是一项涉及从模板链中鉴定核苷酸序列的技术。特定区域的靶向测序，如细菌的 16S rRNA 基因，对于鉴定基于生物化学的测试或 MALDI-TOF MS 库中未包括的罕见病原体可能特别有用。例如，按蚊伊丽莎白菌(*Elizabethkingia anophelis*)，是伊丽莎白属的一种稀有菌种，很少引起人类感染。该种于 2015 年 12 月在威斯康辛州、密歇根州和伊利诺伊州(Wisconsin, Michigan, and Illinois)造成了一个多州集群，随后在伊利诺伊州发现了第 2 个集簇[29]。如果有怀疑暴发的病原，靶向测序可能是有效的，但如果病因不明，可能需要全基因组测序(WGS)。

全基因组测序也越来越多地用于菌株分型和传播事件的追踪。与经典分子方法(如脉冲场凝胶电泳和多位点序列分型)相比，该技术提供了更高的分辨率[30-31]。但是，尚未建立用于 WGS 数据分析和确定应变相关性的金标准方法。常用的方法包括核心基因组多位点序列分型、比较菌株的核心基因组、利用等位基因差异进行系统发育聚类分析(phylogenetic cluster analysis)，以及检测单个核苷酸变化的单核苷酸多态性分析物种突变率的知识可用于确定集簇中的菌株代表单个暴发菌株的可能性，或者可用统计模型确定菌株相关性的阈值[31-32]。为了确定暴发中最可能发生的传播事件，必须将 WGS 数据与流行病学数据配对。

WGS 在暴发调查中的效用已被反复证明。2011 年，该方法被用于追踪 NIH 发生的产碳青霉烯酶的肺炎克雷伯菌的暴发，因此受到了全国的关注。根据医院内患者的流行病学重叠情况，测序数据用于证明尚未出现的传播事件，并且发现在传播事件中患者不同身体部位的分离株是传播事件的独立因素[33]。同样，对于由耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)引起的暴发，文献已用 WGS 数据识别病例、确定来源、确定传播事件并评估已实施的感染控制措施的有效性[34-35]。WGS 也已用于调查社区暴发，如由结核分枝杆菌引起的暴发[36]。CDC 已资助了 5 个州公共卫生实验室对结核分枝杆菌分离株进行 WGS，目的是将来对美国所有分离株进行测序(https://www.cdc.gov/amd/project-summaries/tuberculosis-surveillance.html)。

最近已经证明了常规 WGS 用于检测传播事件和指导隔离决策的实用性和可行性[37]。对所有临床分离株的常规测序可以早期发现发生率更高的菌株，鉴定当地罕见的新发菌株，以及以前曾引起疫情的复发菌株。目前，由于缺乏训练有素的人员和生物信息学基础设施等因素，很少有临床微生物学实验室常规进行流行病学测序。但是，预计测序成本将不断下降，生物信息学工具得到改进，且操作程序日益标准化，测序可能会在未来的医院实验室中被应用得越来越广泛。

(四)疫情监测与调查

实验室应参加与暴发有关的病原体及其发生率变化的常规监测。尽管实验室数据系统各不相同，但许多系统都有能力为所有具有特定病原体的患者生成报告。例如，由于在外科手术过程中使用的加热冷却器系统被污染而引起的奇美拉分枝杆菌(*Mycobacterium chimaera*)的暴发，导致医院需要确定可能接触或感染该菌的患者[38-39]。这要求实验室根据其分离鉴定的水平来鉴定所有的奇美拉分枝杆菌分离株、鸟分枝杆菌-胞内复合物或非结核分枝杆菌，以便进一步回顾患者的病史。可以使用某些软件通过实时预警报识别特定病原体，或提供可用于监控分离株数量的报告。

易感性数据分析可能在暴发调查中有用。例如，对可疑集簇中分离株的药敏谱进行比较可以用作初始筛选潜在相关菌株。从药敏数据生成的抗菌谱是另一个潜在的工具，因为药敏性随时间的变化可以反映出特定病原体的出现。但是，抗菌谱的使用受到了限制。这是由于数据具有回顾性，仅包括首次分离株，仅报告常规检测的药物。如果实验室没有向医院信息系统报告所有经过测试的抗微生物药物，实验室数据系统应能够存储所有抗微生物药物敏感性结果，以便进行完整的分析。

实验室可能是假性暴发的原因，因此，应在暴

发调查期间检查实验室流程。在2013—2014年，由于羊血琼脂板被污染，导致了2次单核细胞增生李斯特菌的假性暴发。在大多数病例中，李斯特菌与临床情况不符。该菌通常是从与李斯特菌感染无关的来源中分离出，如尿、伤口和脓肿。机敏的实验室技师参与了假性暴发的识别，因为他们注意到这种微生物在未接种的平板上、培养基表面以下和划线之外生长[40]。在暴发调查期间，应评估实验室和临床实践的变化。由于培养条件的改变和临床医生医嘱方法的改变，改变了细菌的分离，这已被证明是假性暴发的原因[41-42]。同样，引进新的改进的技术，例如，MALDI-TOF MS可能会导致实验室报告体系和鉴定出的菌种发生变化，而临床医生对由此产生的不必要关注并不熟悉。

六、暴发情景的精选实例：医疗保健机构、受污染产品和食源性疾病

第9章详细讨论了医疗保健机构中的感染暴发。医疗保健机构法定上报是为了不断完善基线监测。医疗保健相关感染上报数的增多给实验室持续监测和某些感染报告增加了额外负担。此外，一些机构出于当地的感染控制需要，要求实验室进行持续的环境监测。用流行病学指导调查是非常重要的，因为散发的环境培养既可能高估也可能低估病原体的存在，而感染仍可能存在[43-44]。

医疗保健机构对于调查社区暴发至关重要。例如，2015年7—8月在南布朗克斯发生的嗜肺军团菌暴发，这是纽约市有史以来最大的一次嗜肺军团菌社区暴发，也是美国有史以来第2次大暴发，共有128例病例和12人死亡（https://www1. nyc. gov/assets/doh/downloads/pdf/han/alert/legionella-in-bronx-source-identified. pdf）。临床医生在诊断具有相似症状的患者中至关重要，临床微生物学实验室能够从呼吸道培养物中分离出病菌，从而确定社区的冷却塔是此次暴发的来源。由于通常采用尿抗原检测来诊断军团病，卫生部门、实验室和临床医生之间必须进行持续沟通，以确保对收集的呼吸道标本进行培养，以分离用于分型研究的菌株。临床医生必须意识到军团菌需要一个特殊的医嘱，因为进行培养需要特殊的处理、培养基、高湿度的孵育及延长培养时间。

在暴发研究中日益重要的另一个领域是药物的制备、运输和分发。有一案例，外科重症监护室发生黏质沙雷菌和阴沟肠杆菌菌血症暴发，可能是因为医护人员外源性污染胃肠外麻醉药芬太尼造成。在分析患者、环境和药物样本后，实验室在排除环境原因，证明芬太尼液和血液的分离株的同源性中发挥了关键作用[45]。在最近一次黏质沙雷菌暴发中，研究者确定氢吗啡酮和吗啡从注射器中转移出来并用受污染的盐溶液代替是可能的暴发源。尽管所用的注射器无法进行培养，但脉冲场凝胶电泳分析证明了来自5例集群患者分离株的相关性，并且在负责篡改的医护人员被停工后，暴发终止[46]。这些暴发表明有必要对麻醉药品进行密切监测，并在怀疑有篡改行为时，监测细菌感染群。

涉及多州暴发真菌性脑膜炎，实验室在确认符合定义的病例、调查受污染产品、特别是鉴定哪个批次受污染中起了关键作用。表10-6回顾性分析了这项调查，以及实验室在暴发调查关键步骤中起的作用。以表10-3为模板，显示了多州暴发的真菌性脑膜炎和田纳西州合成制药外源性污染导致的病例具有联系[47-48]。实验室通过证明产品和感染之间存在着明显关联，从而提供了证据，以保证个别机构级别或修订法规方面进行更改。

2016年6月，由LLC制药技术有限责任公司制造的口服液(docusate)污染，导致洋葱伯克霍尔德菌在多州暴发。当从非囊性纤维化患者中分离出洋葱伯克霍尔德菌时，卫生保健提供者和实验室工作人员通过警示公共卫生部门，为疫情调查做出贡献。FDA和CDC的调查显示，暴发的原因是制造过程中使用的水系统受到了污染。2017年8月，又发生了第二起由同一制造商生产的液体多库酯与洋葱伯克霍尔德菌相关的多州暴发（https://www. cdc. gov/hai/outbreaks/b-cepacia/index. html）。FDA建议不要使用制造商的液体产品，并且产品被自愿召回（https://www. fda. gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm571328. htm）。

由于密集的食品网络供应和销售链，食源性疾病监测成为美国最活跃、最协调的监测系统之一，此系统涉及地方实验室和参考实验室。FoodNet是

一个哨点监测系统，在美国有 10 个参与站点，并和美国 CDC、USDA 和 FDA 保持了密切的合作。它关注实验室对疾病的检测和记录，并给出食源性和腹泻性疾病发生率基线及其在美国的分布。这些站点一共调查了大约 15%的美国人口[49]。

表 10-6 2012 年由受污染的类固醇注射剂导致的真菌性脑膜炎病例在多州暴发调查步骤[a]

步骤	具体描述
1. 准备调查	田纳西州卫生部获得基线数据，包括少见真菌 CNS 感染的特性和已知的硬膜外注射与感染的联系
2. 查证诊断	第1个病例通过 CSF 培养证实烟曲霉感染，L4-L5 间区活检组织革兰染色发现分枝的菌丝成分，这符合烟曲霉特征
3. 建立病例定义	针对 1 例近期接受硬膜外注射而致曲霉菌性脑膜炎患者的回应，CDC 开展了其他病例的主动监测。病例定义为 2012 年 5 月 21 日之后在美国田纳西州接受硬膜外或脊柱旁糖皮质激素注射后发展成有真菌性脑膜炎、后循环卒中、脊椎骨髓炎或硬膜外脓肿症状的患者
4. 查找病例	通过主动监测识别其他病例。首先调查来自相同诊所的病例，包括那些接受甲泼尼龙注射者。在第 1 例后，21 例病例实验室证实均有喙状突脐孢菌(*Exserohilum rostratum*)感染
5. 描述流行病学	通过详细的图表，收集患者数据及其他因素，包括在过程中使用的共同产品
6. 提出假说	确定病例与甲泼尼龙注射剂单剂量瓶相关后，马萨诸塞州卫生部联系供货方-新英格兰调剂中心(New England Compounding Center，NECC)
7. 评价假说	从临床样本中获取脑脊髓液、菌株和组织送往 CDC，使用 PCR 扩增真菌 DNA 和基因组测序方法鉴定病原体。FDA 同时对从 NECC 收集的未开启甲泼尼龙药瓶进行分析，发现检测为阳性。在相同诊所接受其他药物注射的患者没有病症发生
8. 精练假说并进行额外研究	根据甲泼尼龙药物制造商的分销情况，迅速将田纳西州另外的 2 家诊所纳入调查，识别出超过 65 例患者
9. 执行控制和预防措施	2012 年 10 月，NECC 召回弗雷明汉工厂生产和分销的所有产品
10. 交流发现	CDC 定期接收及传达由 NECC 产品造成的真菌感染率报告。FDA 建议对已使用 NECC 产品的患者进行随访，并建议扣缴仍在流通中的问题产品

注：[a] 见参考文献[47-48]

在任何时候，食源性疾病都可能引起暴发，此疾病一直处于定期监测中。据估计，国内每年有 940 万例感染食源性疾病，由 30 多种病原体引起。此疾病估计每年导致 55 961 人住院，1351 人死亡[50]。最近几年，美国人饮食内容改变，包括未煮熟食物、进口食物和大规模生产食物等，都给食源性疾病暴发的调查增加了挑战。在当今的市场上，来自多州或多个国家的许多地点加工处理的食品并不少见。

除了 FoodNet 外，PulseNet 也是一个国家级的菌株分型网络，有超过 80 个国家和地方的公共卫生实验室和联邦食品监管实验室进行食源性疾病的分子监测。他们通过脉冲场凝胶电泳，多位点可变数串联重复分析，以及最近通过使用 WGS 来分析 DNA 指纹图谱。网络中的实验室常规检测和报告 8 种细菌亚型：包括大肠埃希菌 O157∶H7、产单核细胞李斯特菌及沙门菌多种血清型。

PulseNet 实验室于 2013 年采用 WGS 进行李斯特菌的分型，发现李斯特菌属的数量增加，但每次暴发的病例数减少(https://www.cdc.gov/listeria/pdf/whole-genome-sequencing-and-listeria-508c.pdf)。当发现集簇时，流行病学家与 CDC 和地方卫生部门合作，对患者进行标准化访谈，以识别与集簇相关的食物来源。此外，WGS 数据与 GenomeTrakr 公开数据库进行了比较，该数据库可通过美国国家生物技术信息中心(NCBI)访问。GenomeTrakr 网络由 FDA、公共卫生和大学实验室组成，它们提交食源性病原体 WGS 和地理数据。由 FDA 和 CDC 赞助的 GenomeTrakr 协作项目正在进行中，此项目对美国所有临床的李斯特菌属、食品和环境分离株进行 WGS(https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/WholeGenomeSequencingProgramWGS/ucm363134.htm)。

2017 年 7 月，PulseNet 实验室采用 WGS 调

查与从墨西哥 Carica de Campeche 农场进口的马拉多木瓜的食用有关的沙门菌病暴发。测序表明，来自基安布市（Kiambu）患病个体最初分离的47株肠沙门菌血清型在遗传上相似。然而，从一家杂货店的马拉多木瓜样本中分离出了肠沙门菌汤普森血清型和暴发菌株，这促使进行进一步调查。到8月份，利用 PulseNet 数据，研究者证明61例沙门菌汤普森病例与暴发相关。FDA 对来自 Carica de Campeche 农场的马拉多木瓜进行了检测，结果发现了其他血清型，并鉴定了与暴发相关的肠沙门菌 Agona 血清型（S. *enterica* serotype Agona）和肠沙门菌鸡血清型（S. *enterica* serotype Gaminara）。截至2017年9月，病例数达到210例，疫情遍及24个州。此外，研究者还在其他农场发现了受污染的马拉多木瓜。而这些木瓜是3起独立暴发的原因（https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks-active.html）。

七、全球暴发中信息公开和联系的资源

随着互联网监测和其他社会媒体工具的发展，人们识别、交流和应对暴发的方法发生了翻天覆地的革命性变化。在过去几十年中，WHO 经常回应那些先前被认为是非传统资源（如媒体监控系统）而触发的暴发调查[51]。尽管有国家和国际公共卫生机构持续收集信息，但是那些最落后的国家无基础设施来上报或预警公众[52]，互联网或移动资源可以支持对疾病最易感但又缺乏基础防控设施的高风险地区。在此，笔者列出了一些广泛使用并被引用的资源。这些系统中，很多不仅追踪人感染，还追踪人畜共患感染。这是由于许多暴发起源于家养动物或野生动物，监测动物对全面综合监测而言非常重要。

GeoSentinel（http://www.istm.org/geosentinel/main.html）是一个监测旅游相关发病率的全球交流和数据采集平台。国际旅游医学协会（ISTM）和 CDC 在1995年建立 GeoSentinel，将它作为 ISTM 成员旅行/热带医学诊所网络。它的成员可以通过 e-mail 相互联系，它提供了一个交联的网络，可以快速和公共卫生官员交流。当人们遇到异常的诊断或暴露时，可以非正式地提供线索并接受调查，以评估疾病的发生率[53-54]。

世界暴发情报网（ProMED-mail，http://www.promedmail.org）是由 Joshus Lederberg 在1994年美国科学家联盟和 WHO 的会议后建立的，它是一个关于新的或正在发生暴发的免费电子邮件预警系统[55]。各个领域的专家小组挑选并评审现有会员的意见书，他们提供专家评论和文献来源，然后给来自180多个国家的60 000余位用户发出报告。在 SARS 暴发期间，它作为早期预警系统，担当了实验室通信网络平台的作用。

全球公共卫生情报网（GPHIN）是由加拿大公共卫生署运行的一个收费订阅服务网络，它能实时扫描新闻，并以6种语言推送给它的成员[56]。发送的信息没有经过验证，也没有附参考文献。虽然超过60%的初次报告来自非正式的渠道，但是 WHO 已经将 GPHIN 纳入其全球暴发警报应对网络，并致力于验证暴发报告（http://www.who.int/csr/alertresponse/epidemicintelligence/en/）。Google Flu Trends 用谷歌搜索查询来跟踪和定位全球流感[57]，在2009年的 H1N1 大流行中运行良好[58]。

HealthMap（http://healthmap.org）是波士顿儿童医院建立的一个多渠道监测项目，它整合了 Google News、ProMED-mail、Eurosurveillance 和来自 WHO 官方文件及其他来源资料，成为实时更新的容易使用的地图[59]。用户可以在移动装置（mobile app）更新数据，或者用智能手机报告暴发。

紧急情况、疾病和灾害的创新性支持（Innovative Support to Emergencies，Diseases，and Disasters，InSTEDD）是一个日益增长、非营利、发展开源技术并专门服务于弱势群体的组织。目前，它发展了当地媒体工具，并希望最后整合医疗服务数据，在需要的地区促进认知度，并用创新性方法解决健康问题（http://instedd.org）。

Outbreak Database（http://www.outbreak-data base.com）可以用于研究卫生保健相关的暴发。它是查理特（Charité）大学医院（德国，柏林）维护的开放资源，包含了世界各地医院内暴发的最新文章，可以提供一些关于严重暴发或解决科学导向问题的相关文献，可以为有效制定预防感染政策提供帮助。使用分子诊断学技术鉴别相似暴发事件定位可能当前调查的参考实验室，这些

对实验室人员非常有价值[60]。

八、结论

全球化的兴起凸显了应对暴发时，考虑成立世界卫生组织联盟的重要性。地区临床医生、实验室工作人员和公共卫生人员始终是暴发团队的强有力成员。然而，他们必须与州、国家、国际机构和专业组织对接，以便快速行动、精准定义和阻挡暴发扩散的浪潮。病原体的鉴定变得更快捷、更灵敏、更准确。今后，实验室在传染病暴发调查中将继续起着关键乃至更大的作用。

参考文献请扫二维码查阅

第11章 分子流行病学

EIJA TREES, TERRY FEI FAN NG, DUNCAN MACCANNELL,
PAUL A. ROTA, PETER GERNER-SMIDT

（孙宏莉 译；胡必杰、宁永忠 审校）

近几十年，由于临床微生物学和流行病学科相互交叉融合，人们对感染性疾病有了更深入的了解。在感染性疾病背景下，流行病学是对人类病原体传播的研究，包括人群中感染性疾病的危险因素及控制[1]。从发现微生物病原体开始，感染性疾病流行病学就与实验室科学有着密切的联系。20世纪70年代分子技术引入前，感染性疾病流行病学主要由传统微生物学中基于培养和表型鉴定、分型方法推动其发展，如生物分型技术、血清学分型技术、噬菌体分型技术及抗微生物药物敏感性检测，这些方法用于发现病原体并研究其传染源、传播途径、地理分布、感染动态（包括感染病暴发的发现和调查）、疫苗效果评价及疾病预防措施等。

自20世纪70年代以来，在微生物学实验室，快速发展的分子学方法逐渐替代了表型分型的方法。这个新方法的引入产生了一个新的学科——分子流行病学。简单地说，分子流行病学就是利用分子（以核酸或蛋白质为基础）技术来解答流行病学问题。随着分子流行病学的引入，感染性疾病流行病学的研究到达了一个新的高度。分子流行病学已不再是遥不可及的尖端科学，与其相关的设备和试剂很容易获得，并且几乎所有的临床或研究型实验室都有开展分子研究的专业技术和设备。现在，人们对微生物病原体毒力形成的分子机制有了更深的了解，随着时间的推移，以往用于追踪微生物病原体的分型方法将变得更快、分辨率更高，因此功能更强大。目前，许多感染性疾病的病原学诊断无须培养，在数分钟或数小时内即可得到结果，因此使得快速、特异性的治疗成为可能，这些技术同样也可用于突发公共卫生事件的快速检测应答。

分子流行病学常常与另一个微生物学科混淆，即分子分类学，它们既相关又有差异。分类学是一门研究微生物分类、鉴定及命名的学科。分类学中研究微生物进化关系的分支学科称系统发育学。分子方法引入之前，系统发育学的研究仅依赖于表型特征，而这种方法不够准确并且常产生错误的信息。核酸杂交技术的应用及管家基因序列的分析极大提高了人们对微生物进化的认识。相对于分类学和系统发育学，分子流行病学聚焦于微生物种群近期的动态研究。另外，分类学和系统发育学描述的是微生物之间的相互关系，而流行病学阐述微生物、宿主及周围环境的相互关系。2种学科可应用相同的分子方法，根据不同的研究目的，即是分类学还是流行病学，而选择适宜的分子方法。

在分子流行病学领域，分子方法用于检测、鉴定、分析毒力特征及对分离株特异性分型标志（或指纹）进行分型，用于评价分子流行病学关系[1]。本章将介绍分子流行病学及其相关的重要的概念。部分分子流行病学常用术语参见表11-1。表11-2总结了已使用的、正在发展的和未来可能继续补充或替代现有方法的分型技术，并介绍了这些方法的重要特点及应用。本章将讨论分子生物学分析工具的发展策略，包括验证和质量控制。同时，给出了不同目的的流行病学的方法选择标准，解释了不同方法如何影响流行病学数据。

表 11-1　分子流行病学常用术语定义[a]

术语	定义
分离株(isolate)	分离培养基上的单个菌落纯培养后得到的微生物细胞群
菌株(strain)	表型和(或)基因特征区别于同一种属内其他分离株的一个或一组分离株
克隆株(clone)	一组起源于共同始种的直系分离株,可复制并在宿主间或由环境向宿主传播 在本文中,另一术语"暴发流行株"与其含义相同
亚型(subtype)	使用专门的分型系统得到的一种具有特定的模式或一系列标志的菌株
分型能力(typeability)	通过特定的方法对某菌株进行亚型分型时,可分型的比例
重现性(reproducibility)	同"重复性"。分析方法重复检测得到相同结果的能力。通常用某已知种群的菌株重复检测得到同一分型结果的比例来表示
稳定性(stability)	一种分析方法将流行相关株(如来自同一个单一菌株的暴发流行株,来自同一患者,或连续在体内传递或在体外转种数代的菌株)归为同一型别的能力。通常用流行相关株中同一型别的比例来表示
分辨力(discriminatory power)	一种分型方法区分非流行相关株的能力
流行病学一致性(epidemiological concordance)	分析方法将流行相关株关联在一起的能力
可比较的分型(comparative subtyping)	由于实验室内数据的现性差,需要对同一实验室中相同或少用的不同实验方法得到的分型结果进行比对
确定的分型(definitive subtyping)	不同的实验室和(或)不同批次得到的分型结果可与参比数据库进行比对并保存于该数据库
数据库分型(library subtyping)	存有分型确认得到的菌株分型结果的数据库。本书与"确定的分型"同义
簇(cluster)	在特定时间和地点(无其他流行病学事件发生)突然出现引起的流行病学事件的特定型别临床微生物分离株
暴发(outbreak)	同"流行"。在特定的时间和地点突发的感染流行
散发(sporadic)	与"暴发"相对。感染的发生与暴发无明确关联
地方流行性(endemicity)	感染疾病以特定的频率持续存在于某一地方或区域的特性

注:[a] 部分引自 van Belkum 等[1]及 Struelens[266]的著作和文章

一、分型方法

(一)分型方法的特点

1. 分型能力　理想的分型方法应包括流行株内的绝大多数病原微生物的亚型构建数据。一种方法的分型能力是可以通过计算可分型分离株占分离株总数的百分比得到的。所有分型方法对目标微生物(某些微生物的质粒分型除外)均有非常高的分型能力。

2. 重现性和稳定性　重现性指的是一种方法对一个分离株在不同时间和(或)地点的独立条件下进行检测,得到相同型别的能力。在反复检测中使用相同的参数对菌株所占的比例进行计算,会产生相同的结果。这个术语有时也称为重复性。一种方法的重现性和可靠性通常与所生成数据的质量直接相关。重现性可能会受到很多因素的影响,如材料的准备(生长条件或 DNA 的提取)、不同批次的试剂、不同类型的仪器及观察、分析、解释结果时的偏差。有些重现性差的方法,在不同实验室得出的结果无可比性,这些方法常认为是可比较的。而其他重现性好的方法,尽管操作的时间和(或)地点不同,亦可识别出相同的型别,这就是可用于分型确认的方法。

重现性包括实验室内和实验室间两个方面。目前许多实验室的实验室内重现性依照严格的质量保证大纲(如参考《标准化和临床实验室改进国际组织》体系)很容易通过建立健全的标准化程序加以控制。然而,实验室间的重现性控制较为困难,比较不同实验室的结果至关重要。

表 11-2 分型方法的特点和应用

特征	质粒分型	脉冲场凝胶电泳(PFGE)	全基因组谱图	随机扩增多态性DNA(RAPD)/重复序列 PCR(Rep-PCR)	PCR 核糖体分型	多位点序列分型(MLST)	多位点可变数目串联重复序列分型(MLVA)	基因测序	DNA 微阵列检测单核苷酸多态性	全基因组测序	质谱分析
重现性	好	好	好	差	好	好	好	好	好	好	好
稳定性	不定	好	好	差/中	好	好	较好	较好	好	较好	好
分辨力	不定	非常好	非常好	好	好	较差	非常好	非常好	最好	非常好	差
通用性	是	是	是	是	是	否	否	否	否	是	否
分型数据库的适用性	是	是	是	否	是	是	是	是	是	是	是
数据的复杂性	简单	复杂	复杂	复杂	简单	简单	简单	简单	简单	非常复杂	简单
操作难易性	简单	较复杂	较复杂	简单	简单	较简单	简单	较简单	较简单	复杂	简单
成本[a]	低	适中	高	低/适中	低	适中	适中	适中	适中-高	高	低
适用范围	其他方法的补充手段	暴发流行病学监测的大规模数据库的建立	帮助下一代短序列测序分析的拼接	回答有限的流行病学细节问题/用于小范围暴发的调查	艰难梭菌(C. difficile)的一线分型方法	系统发育研究,弯曲菌属(Campylobacte)分类,在法医领域具有潜在的应用价值	暴发的监测,大范围数据库分型(标准化为前提),对于归类及在法医领域有很好的潜在用处	暴发的监测,大范围分型数据库,系统发育研究,法医微生物学,归类	暴发的监测,大范围分型数据库,系统发育研究,法医微生物学,归类	暴发的调查,大范围分型数据库,系统发育研究,法医微生物学,归类	亚种水平鉴定(血清型,致病型)
评价		细菌高分辨率分型的"金标准"		Rep-PCR:半自动方法可能适用于区域研究							

注:[a] 指南/自动版本

靶基因标志物稳定性也间接影响了该方法的重现性。在暴发期间，选择的标志物应保持稳定，并且在多个独立患者个体之间不会出现干扰流行病学特征图的差别。选择的方法得到的基因指纹也不应受到体外操作的影响，如反复冻融和连续传代。

3. 分辨力 分辨力指的是一种能够区分非相关株的能力。分辨力的客观衡量指标可通过计算获得 Simpson 多样性指数(DI)[2] 获得，该指数可估计将两种非流行相关株鉴定为不同亚型的概率。

$$DI=1-\frac{1}{N(N-1)}\sum_{j=1}^{N}aj$$

公式中，N 是不相关待测菌株的数量，aj 是其亚型与第 j 个菌株鉴别不开的菌株的数量。DI 值为 1.0 时表示所有菌株均可互相鉴别，0.95 是分型方法的理想临界值，高于该值，则意味着该方法可用于暴发流行病调查。

该函数是表达菌株亚型的数量(丰度)和每个亚型的菌株比例之间关系的一种函数，即不同型别之间分布的均匀度。从 DI 指数值本身不能确定分型方法的丰度或均匀度。当比较不同的分型方法时，也应考虑这一点。为解决该问题，出现了其他几种多样性指数，其中 Shannon 指数(H)[3] 最常用。然而，这个指数的上限是一个产生已知菌株数型别数量的直接函数，因此难以解释指数大小的差异，除非种群研究得到了相同数量的型别。判断分型方法丰度的一种更简单、更易于理解的途径是，创建一个直方图来显示不同型别的分布。图 11-1 中 A 和 B 所示的 2 种不同的方法分别对相同种群的 100 个菌株进行分型，并对 2 种方法进行假设检验得到的结果显示：方法 A 中的一项指数略高于 B；而在直方图中，其之间的差别是显而易见的——方法 A 丰度高于方法 B。100 个菌株分析后得到 74 个型别，通过方法 A 得到的各型别菌株数为 5 个或 5 个以下，而通过方法 B 得到的最常见的 6 个亚型涵盖了一般的菌株，并且总的来看，方法 B 得到的亚型只有 43 种。

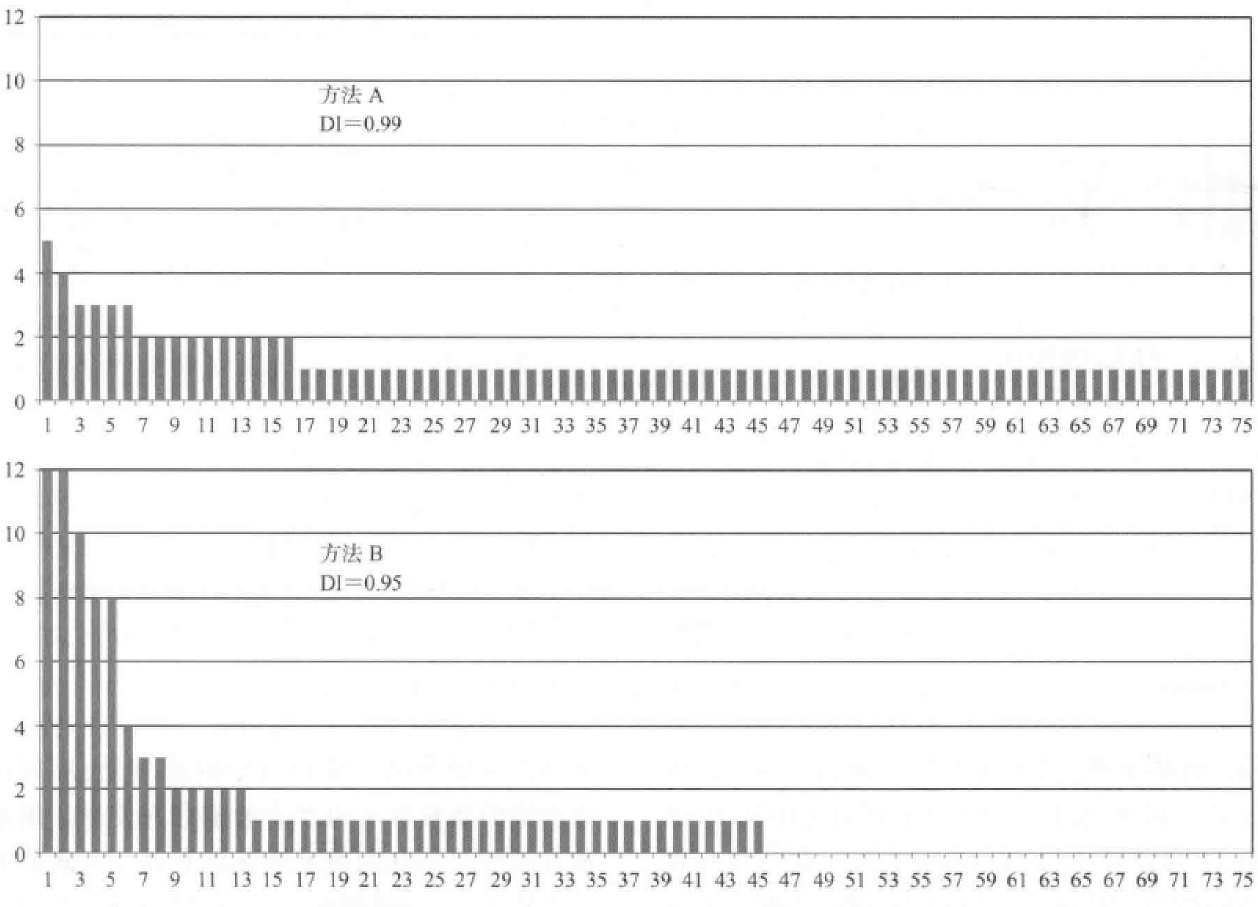


图 11-1 2 种亚型分型方法得到的 100 个流行病学非相关假设样本菌株的分布情况

理想的方法应具有很强的分辨力，能够鉴别所有流行非相关菌株（即具有高度特异性）。同时，该方法也应该能够将同一来源的相关分离菌株归并（即具有高敏感性）。换句话说，使用高敏感性和特异性的方法才能得到流行病学相关数据。一种方法具备的将流行相关菌株归并的能力有时也指流行病学一致性。

4. 适当参数 有很多适当参数可以评估分型方法，如分析数据的速度、成本、操作、人员要求及结果解释。一种方法快速产生数据的能力受该方法通量、步骤数、手工操作时间及是否可自动化几种因素的影响。理想情况下，分析结果应该在一个工作日内获得。成本则受到多种因素的影响，如设备最初的投入资金和基础设施建设、试剂和耗材价格、操作人员数量及技术水平。成本通常是影响常规微生物学实验室中能否实施该方法的最关键的因素。成本通常是影响临床微生物学实验室能否实施该方法的最关键因素。方法的简易程度包括技术操作的简易性、是否为高通量及结果评分的简易性几个方面。为了使分析更为简便，数据应该是客观、可进行计算机分析，可使微生物学家能用较低的生物信息学技术去分析，且在不同实验室之间可通用。

另一个适当参数是这种方法是否具有通用性、广泛地高有效性、重现性和高分辨能力。一种方法可鉴定的微生物种类越多，则在其实验室中的地位也越高。

(二)非特定靶向法

图 11-2 展示了一些非特定靶向法的简单操作流程。

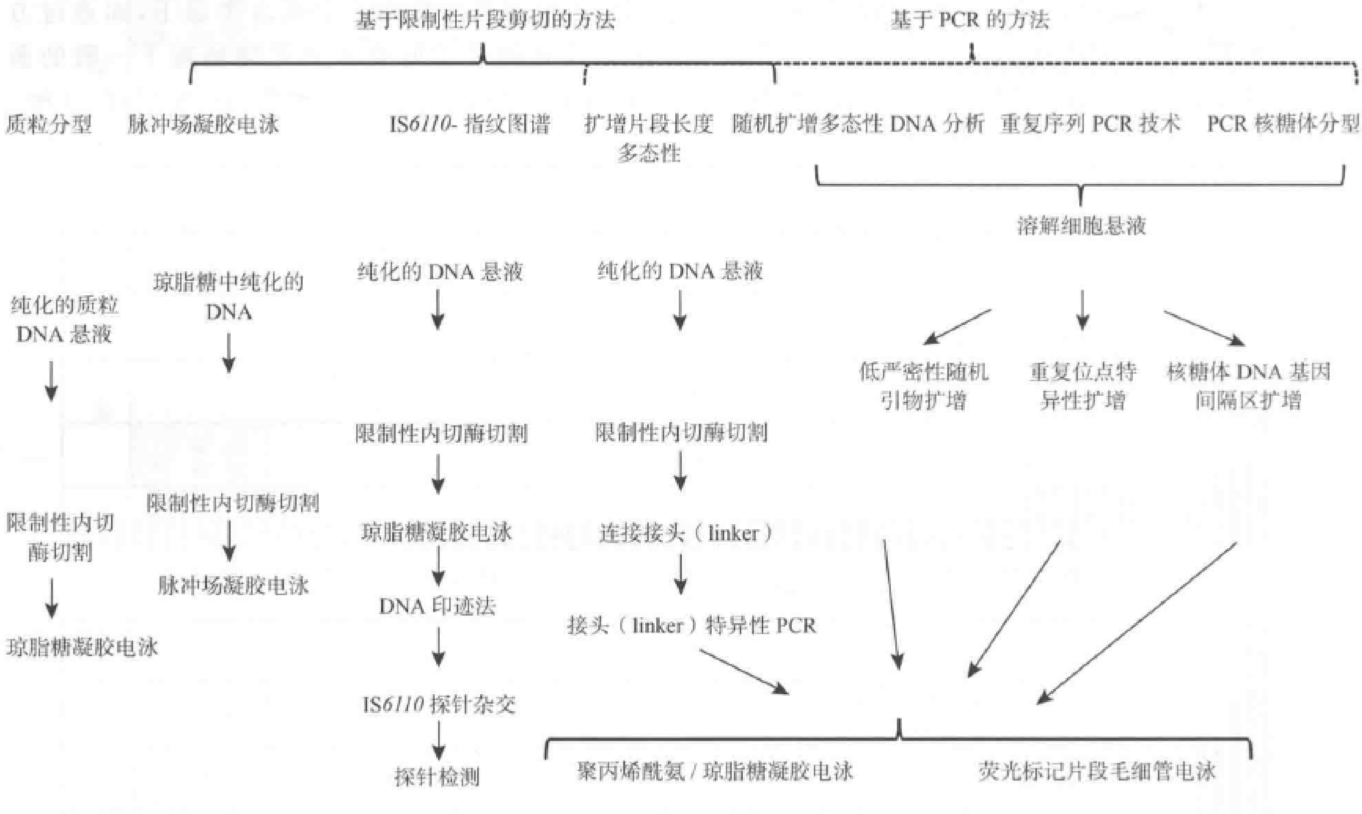


图 11-2 一些常用的非特异性标记分型方法的操作程序

1. 质粒分型 质粒存在于细菌和一些真核细胞中，是一种染色体外能够自主复制的环状 DNA 分子。其大小从 1 kb 至 1 Mb 以上。在宿主机体内，质粒携带的基因除可自我调节外，还赋予了自身某些特定属性（如抗微生物药物耐药性或毒力）。质粒分型（plasmid profiling）的出现可追溯到 20 世纪 70 年代，是最早广泛应用的、基于核酸的细菌分型方法。质粒分型的原理是：不同菌株所携带的质粒数量和大小通常存在差异。通过某种方法使分离株裂解并破坏染色体 DNA，同时质粒保持完整，如碱裂解法[4]，而后经琼脂糖凝胶电泳分离[5]、荧光染料染色（如溴化乙锭），使质粒在紫外线的照射下可视化。

质粒分型具有通用性（即通过相同的基本程

序可鉴定所有具有治理结构的微生物)、廉价、快速、简单且无特殊设备需求。该方法的分型能力是不定的,其对于不同的微生物的分辨力有差异,重现性大体良好,但由于病原体在体内和体外繁殖期间质粒可能会丢失,因此其稳定性并不十分理想。另外,质粒可能会无意中被切割造成其构象结构的改变(从超螺旋形态变成解螺旋或线性形态),影响其迁移特性,导致分析结果不正确。若纯化过程太过激烈,这种改变可能会发生:2 种或所有 3 种构象可能会同时大量出现,凝胶中将出现 2 种或 3 个条带,由于它们在琼脂糖凝胶中具有不同的迁移速率,因此电泳结果可能难以解释。另外,普通琼脂糖凝胶电泳对大于 100 kb 的大质粒分离效果欠佳。大小近似的无关质粒在一块琼脂糖凝胶上可能区分不开。但是,若在电泳前用限制性内切酶对上述大小近似的质粒进行切割,则常可互相区分开。

质粒分型广泛应用于社区获得性感染或院内感染的流行病学调查[6-7],并且在一些国家仍作为一些食源性感染疫情调查的辅助手段[8]。质粒可以在不同微生物之间传播,引起诸如抗生素耐药的暴发。质粒分型是此类疫情调查的第一步[9-10]。

2. 限制性片段长度多态性　限制性内切酶是一种可识别短 DNA 序列并在特定的限制性位点进行剪切的酶。若由相同的限制性内切酶进行消化,可将单一微生物的基因组 DNA 切成大小和数量相同的片段。根据大小的不同,通过琼脂糖或类似的媒介作为介质进行电泳,这些限制性片段可分离开,而后通过染色和在紫外线照射下,可显示该微生物的 DNA 指纹特征或酶切片段。由于不同的菌株基因组存在差异,同一菌株的非流行相关株也通常会显示不同的限制性片段图谱。这种可用于探索限制性片段图谱多态性的分型方法称为限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphisms,RFLP)分析法,其过程称为限制性内切酶分析(restriction endonuclease analysis,REA)。这种方法于 20 世纪 70 年代末到 80 年代引入,在高频酶的作用下对病毒、寄生虫、真菌和细菌进行分型分析[11-14],由此形成 DNA 指纹,包含了可以多达 500 个的限制性片段,片段长度从<1 kb 到 30 kb 不等。这种方法虽然具有普遍适用性,简单、所需资源也很少,但产生的片段通常难以分开,并且 DNA 指纹太复杂因而难以准确分析,尤其是大基因组的微生物,如细菌、真菌和寄生虫。因此,需要找到一种简化 RFLP 分析产生的 DNA 指纹同时保持其分辨力的方法。为达到该目的,可以通过以下方法减少指纹中的限制性片段数量:①减少限制酶作用时片段的产生数量;②减少可视的片段数量。脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis,PFGE)属于前一类方法,后一类方法则十分丰富,其中 IS6110 指纹法下文中将会提到。最后同样也会对光学图谱或全基因组图谱(whole-genome mapping,WGM)进行详细阐述,它并不涉及电泳,可在玻璃板上看到高频酶切位点产生的 RFLP 指纹条带,这些条带是染色体产生的按顺序排列的限制性片段。

3. 脉冲场凝胶电泳　脉冲场凝胶电泳中,DNA 指纹被非高频限制性内切酶剪切,其目的是减少用于分析的限制性片段(宏限制性片段,macrorestriction)。PFGE 法得到的片段大小通常小至约 20 kb,大至 1 Mb 以上。因为不同微生物的 DNA 中鸟嘌呤与胞嘧啶(GC)含量存在差异,因此对不同的微生物进行 PFGE 时所使用的最适限制性内切酶便有所不同[15]。最适限制性内切酶可产生 8～25 个 DNA 片段,将检测的菌株 DNA 片段很好地分离开并均匀分布在凝胶中。

大的 DNA 片段在悬浮液中会发生随机剪切,因此不能有效地纯化。为了避免这一点,可将细胞嵌入固体琼脂糖凝胶中,再将细胞溶解,使基因组 DNA 释放出来并纯化。琼脂糖凝胶稳定了 DNA,避免其在细胞化学性溶解时发生断裂或剪切。而后,完整的基因组 DNA 被非高频限制性内切酶消化。传统琼脂糖凝胶电泳最适用于分离<30 kb 的片段,而无法将大的限制性片段分开。将琼脂糖凝胶中的限制性大片段 DNA 在交替或脉冲电场中(琼脂糖凝胶作为分离基质)进行电泳,这种缺陷将得以克服。自 1984 年引入 PFGE 以来[16],多种不同的 PFGE 平台先后被开发[17-19]。无论何种 PFGE 平台,均会通过预定的方式进行电泳(电场的方向来回交替)。PFGE 过程中,电场中较小的 DNA 片段重新定向(即改变电泳方向)的速度比较大的片段快,因此在凝胶中迁移的速度也更快,使得各片段根据大小的不同得以分离。在一些平台上,电流从一个方向转向另一个方向的时间间隔可更改。电泳开始时电流方向转换的时间常设置得较短,然而在运行过程中持续

增加。

自20世纪80年代起，由于PFGE法具有通用、分型率高(达100%)、分辨力强、重现性好且稳定的特点，一直作为细菌分子分型的“金标准”。从本质上讲，所有基于电泳的方法是可比较的，即只有同一试验内所研究的分离株才具可比性。但是，严格的标准化程序可以解决这个问题，同时对限制性内切酶的选择、琼脂糖的类型和品牌及电泳运行条件也至关重要。自1996年以来，美国细菌分子分型国家网络(PulseNet USA)，国家食源性疾病分子分型监测网络，将PFGE作为分子监测的首选方法，从而证明了其作为分型库方法的实用性[20]。该方法的缺点是需要特殊的电泳设备，而且试验过程会耗费较多的人力，1个人在2个工作日内可能完成20个以内分离株的分型。

4. IS6110指纹 IS6110指纹(IS6110 fingerprinting)是一种RFLP指纹分析的方法，一般用于结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)复合群的分型。它是第一个通过国际标准化的RFLP分析方法[21]，并且始终是结核病(tuberculosis,TB)分子监测的“金标准”。该方法的原理包括：高频内切酶(如PvuⅡ内切酶)对全基因组DNA进行切割，标准琼脂糖凝胶电泳，DNA印迹法将DNA片段转移至硝酸纤维膜或尼龙膜上[22]，包含IS6110插入序列的荧光标记探针与膜上的片段进行杂交，使荧光标记的片段可视化[23]。只有结核分枝杆菌、牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)包含这种插入序列[24]，其中结核分枝杆菌包含10～12个拷贝，而牛分枝杆菌之间只有1～3个拷贝。由于牛分枝杆菌中IS6110序列拷贝数很少，使用这种方法对其进行分型效果欠佳。

这种方法的优势在于，高分型率、重现性和分辨力使其可以进行结核病全球流行趋势的监测和暴发源头的追踪，其缺点是仅适用于监测结核病，并且过程复杂、耗费人力。

5. 全基因组图谱 全基因组图谱(WGM)最初称为光学图谱(optical mapping)，其过程为：单个DNA分子在玻璃表面伸展开，之后进行限制性内切酶分析，再用荧光显微镜观察所得的片段，其排列顺序与其在基因组内的排列顺序相同[25-26]。由完整的基因组产生的限制性片段图谱可用专门的软件进行比对。这项技术是一种强大的分型工具，它不仅可以促进全基因组鸟枪序列片段的拼接，还可比对相近微生物的基因组大小和含量，如毒力基因和噬菌体[25,27-30]，但这项技术复杂而昂贵。经过OpGen公司(Gaithersburg,MD)开发，这项技术已实现自动化、商业化，但由于成本太高，仍限制在公共卫生领域中大规模应用，特别是在当前，全基因组测序(whole-genome sequencing,WGS)的成本与基因组图谱相同甚至更低(通过某些测序平台)。

6. 基于聚合酶链式反应的分型技术 许多单纯依赖于聚合酶链式反应(PCR)或与限制性内切酶分析相结合的分型技术已在上文进行了阐述。这些技术使用的扩增方法和(或)扩增的基因区域不尽相同。分析方法中，若有扩增或限制性内切酶处理的部分，得到的结果片段将会经电泳分离及溴化乙锭染色后可视化。由PCR产生的片段常常很小，因此，在荧光标记的探针作用下，可通过毛细管电泳进行DNA测序观察扩增的片段。

7. DNA异源双链迁移率测定，单链构象多态性分析和单分子计数 DNA异源双链迁移率测定(the DNA heteroduplex mobility assay)是一个非序列分子技术用于基因分型。在PCR循环期间，在高的产物浓度或较低的引物/模板比率下，DNA异型双链更有效地形成。利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术可以区分不同基因型间异双链形成的各种模式。DNA异源双链迁移率测定最初用人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV)的基因分型[31]，同样也已用于有害费氏藻、麻疹病毒(measles virus)和甲型流感(influenza A virus)的基因分型。但是该技术已经被Sanger测序大量取代。

同样，单链构象多态性分析(single-strand conformational polymorphism)同样是移位分析方法，的一种类型，需要单链DNA的片段[35]。含有一个或多个单核苷酸多态性(SNP)的DNA的迁移率与原始序列的迁移率有显著差异。单链构象多态性分析已用于区分肠道病毒(enterovirus)[36]、乙肝病毒(hepatitis C virus)[36]和个别细菌病原体[37]。

最近常使用的杂交基因分型法，如NanoString可用非PCR方法检测特定病原体的核酸。NanoString使用一个与彩色条形码相连的靶特异性探针与样本的核酸进行杂交；然后，用自动化荧光显微镜确定探针的位置从而进行测量。目前，超过800个靶探针可用于实验。该技术已用于区

分呼吸道病原体[38]和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)[39]。

8. 随机扩增多态性 DNA 分析/随机引物 PCR 法和重复序列 PCR 技术　在随机扩增多态性 DNA 分析/随机引物 PCR(random amplification of polymorphic DNA/arbitrarily primed PCR,RAPD/AP-PCR)分析过程中,小的基因片段在低严谨性扩增条件下经短引物(约 14 bp)作用进行扩增将得到随机序列[40-41]。因为 PCR 条件严谨性低,引物与基因某区域完全配对结合时也可出现少量错配现象。结果片段的差异性会产生一个图像,这种图像对于不同菌株来说理论上应具有特异性。重复序列 PCR 技术(repetitive element PCR,rep-PCR)是所有基于 PCR 的分型技术的共有部分,其过程中,散在的 DNA 重复序列之间的区域被扩增。大多数微生物的基因组中存在很多重复序列。最常见的重复序列有:基因外重复的回文结构(repetitive extragenic palindromic,REP)片段,肠道菌基因间重复序列(enterobacterial repetitive intergenic consensus,ERIC)和盒子片段(BOX)[42-44]。

RAPD/AP-PCR 和 rep-PCR 技术都具有通用性,分型率高达 100%、分辨力强(但通常次于 PFGE),其重现性很难控制,尤其在实验室间[45]。但由于重现性差,这种方法实际上很难用于构建有意义的 RAPD/AP-PCR 指纹资料库。Rep-PCR 的半自动化平台已实现商业化,如 BioMérieux 公司的 DiversiLab 系统在过去十年里得到应用[46]。通过这种手工方式,rep-PCR 的重现性问题似乎得以解决[47]。该方法的优势在于廉价(除了 DiversiLab 系统)、快速、易操作,并且适用于调查有限范围内的疾病的暴发(如医院)。

9. PCR 核糖体分型　在 PCR 核糖体分型中,编码 16S 和 23S rRNA 基因之间的区域被扩增。扩增片段的长度得以比较。该方法的优势在于大多数微生物基因组包含多个 rRNA 基因操纵子,并且被扩增的 16S 和 23SrRNA 基因序列之间的片段大小在同种菌株和不同菌株间均存在差异[48]。该方法快速、廉价,具有普遍适用性,分型能力近乎 100%,重现性好,但分辨力一般。虽然已有许多微生物的 PCR 核糖体分型方法曾有描述,但得到普遍认可使用的,主要仅针对一种微生物——艰难拟梭菌(*Clostridioides difficile*,原名艰难梭菌,*Clostridium difficile*)并且已经做出一些努力来标准化实验室和数据分析,从而进行分子监测和感染控制[49-50]。

(三)特定靶向法

图 11-3 展示了一些特定靶向法的简单操作流程。

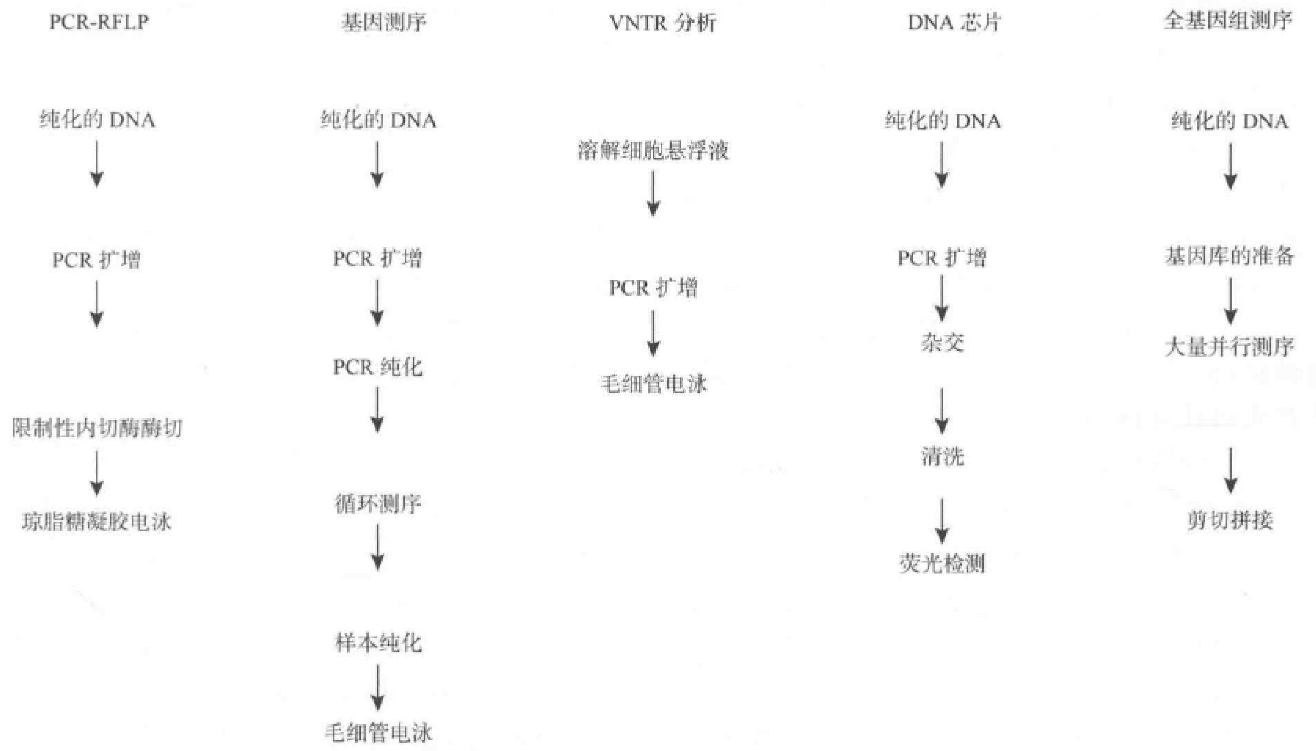


图 11-3　一些常用的特异性标记分型方法的操作程序

1. 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析技术 在聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析过程中，一个短小的DNA片段包含全基因组或部分基因或操作子先扩增，再用一种合适的限制性内切酶对扩增片段进行酶切。最后用琼脂糖凝胶电泳分离目的片段并将其可视化。通过这种方法，不需要测序也可获取扩增片段的相关信息。除了少数特例，这些方法无法鉴定不同种属，但有助于在更高水平上对分离株进行分组或鉴别毒力决定簇(virulence determinants)。这些方法可用于鉴定肠道细菌鞭毛抗原，如针对沙门菌属的鞭毛素编码基因 *fljB* 和(或)*fljC* 和 STEC O157 产毒型大肠埃希菌鞭毛抗原[51-52]，还有热弯曲菌的鞭毛编码基因 *flaA* 的辅助性快速诊断[53]。同样，通过 PCR-RFLP 方法扩增 16SrRNA 可以鉴定表型分型方法不易区分开的细菌种别，如不动杆菌种属(*Acinetobacter*)或分枝杆菌(Mycobacteria)[54-55]。

2. 基因测序 多位点序列分型/多毒力位点序列分析。

多位点序列分型(multilocus sequence typing，MLST)是最早的基于 DNA 测序的分型方法之一。该方法最初由 Maiden 等[56]作为一种脑膜炎奈瑟菌多位点酶切电泳表型分析相对应的基于测序的方法。通过对 350～600 bp(通常含有 5～10 个管家基因)的片段进行直接核苷酸测序，MLST 可检测到突变或重组引起的变异。一些创新技术，如电喷雾电离质谱(mass spectrometry，MS)，也可通过非直接测序的方式确定碱基组成[57]。当一个基因的一个碱基对发生变化，新的基因序列则成为一个单独的等位基因类型。每个基因序列的等位基因类型与多位点序列分型(sequence type，ST)结合，对菌株的遗传相似度特征进行分析。此外，MLST 的结果可以用聚类技术进行分析，如 eBURST 算法，基于 ST 型，可以把不同菌株归于不同克隆群(clonal complexes，CCs)中。通过使用 eBURST 聚类技术，高遗传相似性(例如，7 个等位基因中有 6 个相同)的分离株将会成为一个克隆群[58]。因此，同一克隆群中的分离株之间的关系比不同克隆群的分离株更密切。

由于管家基因选择压力小，变化的积累通常很缓慢。原始的 MLST 方法作为很多微生物流行病学分析的有效工具，分辨力往往很有限，其他类似的系统则针对进化更快速的基因，如毒力相关基因或编码外膜蛋白的基因已开发出。在 MLST 中使用这种与毒力因子相关的方法，称为多毒力位点测序分析(multi-virulence locus sequence typing，MVLST)。2 种方法可搭配使用。Noller 等[59]结合 7 个管家基因(*arcA*、*aroE*、*dnaE*、*mdh*、*gnd*、*gapA*、*pgm*)和 2 个膜蛋白基因(*espA*、*ompA*)对 STEC O157：H7/H 菌株进行分型分析，得到了高度多样化的 PFGE 图谱。总的来说，他们发现所有管家基因均缺乏多样性，*espA* 基因亦是如此，而 *ompA* 的多样性最低。Zhang 等[60]开发了另一种 MLST 方法，其仅针对产单核李斯特菌(*Listeria monocytogene*)的毒力基因(*prfA*、*inlB*、*inlC*)和毒力相关基因(*dal*、*lisR*、*clpP*)，能够鉴定 PFGE 技术无法区分的分离株。另一篇关于 MLST 的文章，其测定目标只有 2 个基因——*por* 基因(编码蛋白质外膜孔蛋白)和 *tbpB* 基因(编码传输结合蛋白亚基 B)，这种方法已经证明是一个具有高分辨力的淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)分型方法，同时能够准确地识别性接触对象[61]。MLST 可用于某些具有可塑性基因组的微生物[如奈瑟菌属(*Neisseria*)]的流行病学监测，它的关键性应用主要是研究物种的系统发生学和进化[62]。MLST 还可用于研究对于不同病原体克隆群宿主易感性的差异或人类感染的毒性潜力[63]。

与凝胶电泳法(如 PFGE)相比，MLST 的一个关键优势在于，其依赖的测序数据结果清晰且不受仪器类型限制，不同实验室数据通过登录 MLST 相关网站即可进行比对，十分简便，如 http://pubmlst.org、http://www.mlst.net。MLST 同样具有 100% 的分型率和高重现性。然而，与一些其他技术(如片段分析)相比，DNA 链多位点双向测序比其他技术耗时、耗力，且价格昂贵。

3. 其他基因测序应用 Lancefifield M 蛋白是 A 组链球菌(group A streptococci，GAS)的一种重要的毒力因子，它也用于血清型分类。这种蛋白质由 *emm* 基因编码，M 血清型也可通过其序列进行预测[64]。完整的 *emm* 基因序列及其测序流程参见 http://www.cdc.gov/streplab/m-proteingene-typing.html。*emm* 基因分型使 M 血清型在科学界得到了广泛认可，但多年来仍有相对

少数的参比实验室仍保留着通过传统分类方法得到的经典病原学信息。由于 *emm* 基因序列的变异比 M 血清型表现出的变异更多，因此与经典 M 血清学分型方法相比，*emm* 基因型提供了额外的 GAS 鉴别要点[65]。

同样，肺炎链球菌（*pneumococci*）荚膜类型也是一个重要的毒力因子。该物质由 *cps* 基因编码，所有肺炎链球菌血清型的 *cps* 基因序列可从 http://www.sanger.ac.uk/resources/downloads/bacteria/streptococcus-pneumoniae.html 网站获得。最近的一项研究表明，通过一对识别调控基因 *cpsB* 的引物进行单纯 PCR 测序技术可以在已知的 92 种血清型中扩增出 84 种，并能区分其中的 46 种[66]。一种巢式 PCR 技术也已开发，它可直接鉴别 29 个最常见的肺炎链球菌血清型，而无须全基因组测序[67]。

耐甲氧西林金黄色葡萄球（Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*，MRSA）具有一个大型异质性可移动遗传因子，携带 *mecA* 基因的葡萄球菌染色体基因盒（staphylococcal chromosomal cassette mec，SCCmec）是甲氧西林耐药性的核心区域，而编码重组酶的 *ccr* 基因位点（*ccrAB* 或 *ccrC*）参与 SCCmec 的转移。SCCmec 的型别由 *mec* 复合体携带的遗传信息与 *ccr* 的类型共同决定，而亚型由 J 区中的可变区决定。到目前为止已确定了 11 种主要类型（Ⅰ～Ⅺ型）[68]。SCC 因子的最新命名法和指南参见由葡萄球菌基因盒染色体因子分类国际工作组创建的 SCCmec 网站（http://www.sccmec.org）。SCCmec 类型的确定与流行病学息息相关，因为不同的 SCCmec 型与医院和社区 MRSA 感染有关。然而，最近的研究显示，某些 SCCmec 型能在医院和社区间传播[69-70]。

病毒的基因分型通过比较基因序列“窗”、参考序列和有亲缘关系的病毒株来实现。通过逆转录酶聚合酶链反应（RT-PCR）或 Sanger 测序法来获得病毒的序列。对临床病毒株或对细胞培养中的病毒株进行核酸提取，然后进行基因分型。PCR 法设计应该具有基因型特异性，引物可以特异性扩增基因片段。另外，RT-PCR 或带有简并引物的 PCR 可用于扩增广泛病毒株的序列。

4. 可变数目串联重复序列分析 许多微生物的基因和基因间隔区包含重复 DNA 序列位点，不同菌株这些位点存在差异，这取决于存在的重复单元数量或独有的结构。可变数目串联重复（variable-number tandem-repeat analysis，VNTR）区域存在于几乎所有原核和真核生物中，并已经成功地用于分型[71-72]。滑动链错配（slipped-strand mispairing，SSM）是解释短重复序列可变性最好的分子模型[73]。当 DNA 聚合酶进行复制工作时，相对较短的重复单元序列的延长可能会产生错误的碱基配对。这促使聚合酶插入或删除单个重复单元。不同重复位点的进化时速不同，有些位点的进化非常缓慢，而其他位点由于进化过快导致其不稳定，不能作为流行病学标志物。因此，前者比后者更适用于流行病学追踪[74]。形式最简单的 VNTR 分析可能只包含一个位点[75]。当多个位点作为目标时，这项技术通常称为多位点 VNTR 序列分析或 MLVA（multiple locus variable-number tandem repeat analysis）[76]。

通过网络获得的免费软件，VNTR 位点可通过部分或完整的参照基因组序列进行鉴定，如串联重复序列搜索引擎（http://tandem.bu.edu/trf/trf.html）或 TRedD（http://tandem.sci.brooklyn.cuny.edu/）。串联重复序列数据库（http://minisatellites.u-psud.fr，http://tandem.bu.edu/cgi-bin/trdb/trdb.exe）也已开发，通过各种参数和查询工具，可帮助鉴定已发布的 VNTR 序列[77]。MLVA 通常涉及以下 2 个步骤：以 VNTR 序列为目标进行多重 PCR 扩增，再使用高分辨率的毛细管电泳检测片段的大小[78]。使用多重荧光染料标记正向引物会增加多个重叠片段靶点。观察到的每个 VNTR 片段的大小决定了等位基因的型别（一个拷贝数或一个任意数），同时不同型的等位基因序列构成了不同型的 MLVA。

MLVA 在流行病学监测领域的关键作用可独立或与其他技术相结合实现。由于 MLVA 靶点为快速进化的重复序列，与其他对高克隆性微生物表现出较小差异的方法相比，其分辨力非常强。例如，在 2001 年美国炭疽暴发期间，人们使用了一种针对 8 个 VNTR 序列的 MLVA 方案，它能够区分实验室污染菌和非流行相关株[79]。有些克隆株通过其他常用的方法，如 PFGE，可显示出较大的差异，但无法鉴别克隆亚群，而 MLVA 可实现。例如，在 MLVA 技术引入前，其他分型方法无法有效地鉴别肠伤寒沙门菌（*Salmonella*）

菌株的104型(DT 104)复合群[80-81]。以快速进化的遗传因子为目标的方法(如VNTRs)的缺陷在于,暴发期间其模式会随着暴发的发展而有所变化,因而数据分析十分复杂,流行病学相关性也会受到影响[82-83]。

此方法的优点是通量高、耗力少、成本低。与其他基于PCR的技术类似,MLVA也受到PCR和片段人工分析影响,如minus-A、出峰状态、荧光标记,可影响数据分析。方法的稳定性和重现性会受仪器和试剂的影响,进而会影响方法的可移植性和实验室间的数据共享。例如,不同的毛细管电泳平台检测结果会有很大差异[84]。然而,通过适当的试验设计和优化,严格遵守标准操作程序及对员工进行培训,这些问题都是可以解决的。当使用不同的技术平台时,使用校准菌株有助于实验室间数据的共享,这些校准菌株的等位基因类型通过与实际序列拷贝数进行比对实现标准化[85]。总的来说,MLVA的主要缺点在于,其通常只针对特定的微生物(甚至是新发现的血清型)。只有少数已公开的方法尝试了覆盖多个血清型或多个种[86-88]。

5. 成簇的规律间隔短回文重复序列分析 成簇的规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPRs)代表原核生物中分布最广泛的DNA重复序列家族。它们最初发现于大肠埃希菌[89],而最近大约90%的古细菌和40%的细菌基因组中也发现了该序列[90]。大多数含有CRISPR的原核生物都拥有多个CRISPR簇(2~20个位点),每一个CRISPR都串联为一个近100个短(21~47 bp)且高度保守的直接重复序列(direct repeats,DRs),称为间隙(spacers)的可变区序列分隔开。许多CRISPR位点两侧为AT富集的前导序列和CRISPR关联(CRISPR-associated,cas)基因。该间隙由外来核酸衍生而来,如噬菌体和质粒,它可使宿主细菌免受同源噬菌体和质粒的继发感染[91-92]。作为细菌的免疫系统,CRISPRs基因随着噬菌体池的改变迅速发生改变。CRISPRs通过删除或获得单元(直接重复序列和间隔区)进行进化。在大多数情况下,新单元的增加发生在CRISPR的末端,并与前导序列相邻,而单元的删除则是随机发生的[93]。越来越多的证据表明,CRISPR的含量可能与该菌株的致病潜力有关[94-95]。

CRISPR位点可以从部分或完整的基因组序列中识别,其结构特点可在CRISPR搜索(CRISPRfifinder)程序中获得,网址为 http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr[96]。得到的CRISPRs存储在一个公共数据库(CRISPRdb)中,该数据库会与自动公布的基因组同步更新。第一个开发出来的CRISPR应用为结核分枝杆菌间隔区寡核苷酸分型,其主要过程为:行PCR扩增后,令扩增片段于薄膜上杂交,再检测一系列间隔区的存在或缺失情况[97]。如今,一个CRISPR方法通常包括对CRISPR位点的PCR扩增、对PCR产物进行Sanger测序或使用寡核苷酸探针杂交的DNA阵列技术检测间隔区的存在或缺失状况[98-99]。CRISPRcompar的免费网络资源(http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr)可供识别已测序的等位基因中的间隔区、添加注释,也可将它们与过去发现的间隔区进行比较[90]。

CRISPR分析可单独或结合其他目标的检测分析来进行流行病学监测。对沙门菌的2种毒力基因进行CRISPR分析和MLST已经成功地用于其菌株分型,而其对肠炎血清型的鉴定也前景光明,该血清型用其他方法鉴定时呈高度克隆性[100-101]。CRISPR分析作为一种鉴定工具效果如何还有待观察,但是考虑到不同的噬菌体具有独特的特定生态位,间隔区的组成可能为特殊菌株的溯源提供线索[102-103]。最近发现的CRISPR和基于Cas-9变异技术的另一个优势在于能够对新型病毒,如寨卡病毒(Zika)、埃博拉病毒(Ebola)等其他新发的病毒感染类疾病进行诊断,且价格低廉。在未来的几年,这种功能强大、灵活的分子工具将会在临床和公共健康实验室对感染病的诊断和分子流行病学分析中起到至关重要的作用[104]。

6. 全基因组测序 第一代Sanger测序技术于20世纪70年代末引入。然而,该技术对微生物基因组测序的价格过于昂贵,且结果难处理,耗时。过去的十年中,高通量的引入使得下一代测序(next-generation sequencing,NGS)技术进行基因组测序时的每个碱基成本急剧减少,同时数据输出量也得到相应提升。早期的NGS平台基于大规模并行焦磷酸测序[105-106]和随后发展的升级技术建立并得到广泛应用,如链接化学反应[107]、

基于半导体介导的测序方法[108]、单分子测序[109]和基因工程蛋白质纳米磁珠测序[110]。目前主要有四个商业化NGS平台，即IonTorrent平台(Life Technologies，Guilford，CT)、Illumina平台(Illumina，San Diego，CA)、PacBio Sequel RS Ⅱ平台(Pacific Biosciences，Menlo Park，CA)，以及牛津纳米孔平台(Oxford Nanopore Technologies，Oxford，United Kingdom)。这些设备分类为"短读序"和"长读序"平台。PacBio Sequel RS Ⅱ平台和牛津纳米孔MinION平台都是"长读序"平台，可对大于10kb的序列进行单分子长度序列测序。相反，Illumina平台和IonTorrent平台是"短读序"平台，可以产生数量从几百万到几十亿，且大小为150～400 bp之间的短序列。每个平台除读序长度有差异外，在样本通量、多路传输、序列输出、检测周期、准确性、错误率及成本几个方面仍存在显著差异[111-112]。对特定的对象选择适当的测序策略，对每一因素均要考虑到。随着NGS技术逐步成熟，另一些问题也相继显现，如硬件、软件、化学用品和耗材等，通过提高样品通量和数据质量，对每个待测样本的测序成本也会不断降低。

全基因组测序(WGS)代表着分子流行病学领域的终极工具，因此，它可以识别2个分离株之间单个基因的变化。该技术逐渐用于社区水平的实时监测和疫情调查。最近，在健康保护设备[113-116]和食源性疾病监测的调查中展现了强大的能力[117-119]。WGS已广泛用于开发针对已知和新发的病原体的新诊断测试方法[120]，它在病原体的发现、特征及病原体的进化、传播的研究中已成为一个重要工具。最近的一个例子是对2009年出现的起源于猪的H1N1病毒进行的全基因组分析，单一病毒的引入显示其在人类间传播了很长一段时间，新病毒株的基因组片段来自于猪、人类和禽类[121]。同样，在2011年德国大肠埃希菌暴发流行间，WGS在了解产生高毒力菌株的决定因素和进化方式方面发挥了决定性作用[122-123]。

随着测序成本及检测技术复杂性的持续下降，宏量数据的管理和分析已成为NGS常规用于感染性疾病监测、暴发检测和应对能力的一个重大挑战。为了公共卫生干预发挥作用，疑似病原体的原始全基因组序列数据必须经过分析、拼接、解释和及时比对，以便采取行动预防或减少疾病相关的发病率和死亡率。对于小范围疫情调查，这些基因数据可以代表该地区的流行病学特征，但对于大范围分子监测，如PulseNet食源性疾病监测网络[124]，每年需从各地区获得大量信息，以从这些信息中得到有意义的流行病学特征。基因"大数据"的挑战需要建立专用的信息基础设施以支持NGS，通过公共健康卫生体系建立高通量实验室技术、整合基因组学、生物信息学、数据科学处理手段。由于大多数该技术的终端用户将是拥有有限的生物信息学技能的临床微生物学家和公共卫生实验室，因此，人性化且直观的生物信息学工具的开发对于大多数测序相关的监测活动非常重要。对全球卫生同样重要的是，为测序质量建立明确、简洁的国际筛查标准，确立数据压缩、存储、传输以及测序相关元数据和针对暴发检测与应答的分析方法。这些问题的解决方法，已经通过全球微生物鉴定者(GMI)网络(http://www.globalmicrobialidentifier.org)启动，GMI由至少40个国家的大约250位专家组成，包括临床医生、食品和公共卫生微生物学家、病毒学家、生物信息学家、流行病学家、资助机构代表人、数据托管系统专家及来自学术界、公共卫生领域、工业领域和政府的决策者。虽然大多数病毒序列可以通过多重序列比对与WGS数据直接进行比较，但由于大多数细菌、真菌和寄生虫基因组相对复杂，很难对它们进行分析。虽然基于WGS的分型策略考虑用完整的基因序列，但关注组序列中的特异性标记物或多态性位点。下面将对几个最常见的方法进行描述。表11-3中列出了一些常用的生物信息学术语。

7. 全基因组单核苷酸多态性分析 全基因组单核苷酸多态性(whole-genome single nucleotide polymorphism，SNP)分析涉及每个查询(或检测)得到的分离株的图谱序列读序，并与参照基因组进行比对以识别和比较单核苷酸变异的位置。参考序列通常是从公共存储库中选择的接近、已完成测序的基因组，或是一个从头拼接得到的高质量流行病学内部重要参考分离株(例如，一个索引案例或公认的资源)，以防外部参考序列不可获得或不适用于调查。后者的示例见图11-4。

表 11-3 生物信息学中常用定义

术语	定义
注释(annotation)	某一序列中基因及基因片段的鉴定和功能的确定
拼接(assembly)	经过处理得到的许多短 DNA 序列片段(如 NGS 测序产生的片段)拼接成与原始基因组相同的序列
重叠群(contig)	许多重叠的短 DNA 序列拼接得到的连续重复的序列
覆盖度(读序深度)[coverage (read depth)]	在重新构建的测序中,读序单位读取的核苷平均数
从头拼接(*De novo* assembly)	无参照序列提示基因组结构条件下进行的基因组拼接
高置信度单核苷酸多态性(high-confidence SNP)	经特定标准(如序列覆盖度、序列质量、种群及等位基因频率)验证的 SNP。然而,这些参数取的差异决于研究对象及 SNP,经典的最小标准为 10～20 倍覆盖度、序列质量分值大于 Q20 及 95%的出现率
插入删除突变位点(indel)	核苷酸的插入或删除导致核苷酸总数的改变
k-mer 序列	长度为"k"的寡聚核苷酸链
N_{50} 统计(N_{50} statistic)	常用于基因组拼接数据的原始评价。它代表重叠群的长度(所有重叠群至少达到序列集中所有碱基对一半的长度)
开放阅读框架(open reading frame)	一种给定序列中不间断的阅读框,可用于基因预测
单一碱基序列质量(per-base sequence quality)	一段序列中单个碱基位置序列质量的得分。通常使用 Phred 分值表示,该分值计算公式为 Q=－10log(错误率)。例如,分值为 Q30,则表示约每 1000 个碱基中在该位置出现 1 个错误
读长(read)	靶 DNA 一次测序获得的 DNA 序列长度
参比图拼接(reference-mapped assembly)	以参比序列为对照拼接出排列相似的新序列
后缀阵列(suffix array)	一个长序列中所有后缀子序列的集合。例如,ATGCATGC 序列代表一段序列 A[i],则其后缀包括 ATGCATGC、ATGCATG、ATGCAT、ATGCA、ATGC、ATC、AT 和 A

由于不同的微生物基因组的大小、复杂性、可塑性、种群多样性、质量和图谱序列读取的覆盖均不相同,因此,候选 SNP 初始群的数量存在很大差异。根据每个序列图识别出的候选 SNP 通常根据序列质量进行筛选,筛选条件有:候选 SNP 的位置、基因分布、变异的等位基因功能影响;种群水平的考量,如等位基因频率、基因融合、同塑性、连锁不平衡。拥有足够的生物信息学专业知识和计算机资源,从参比基因图到最小的一组高确定性、精简的位点形成的精练过程可相对快速地完成。一旦验证,高确定性的规范化 SNP 组套便可作为对待测序分离株进行分析和分型的目标,或作为实时 PCR (real-time PCR)或其他低成本分子技术进行高通量监测的基础[125-126]。

在某些情况下,基于 SNP 的分离株分析方法的表现可能会不够理想,主要是由于其对连续参比基因图存在依赖性。某些微生物没有可用的参照基因组,需要用从头拼接作为参照。一些种群基因可塑性足够大,甚至当保守的参照基因组存在时,使得与历史参照菌株比较不充分或者在基因覆盖区产生重要缝隙,在种内这些序列也可能变异如淋病奈瑟菌或伯克霍尔德菌。同样,微生物中由质粒、转座子或其他可移动基因元件携带的重要毒力和生物多样性因素,其重要的区别位点的信息在已知的参考序列中可能缺失,并且不会基于染色体序列进行种系基因组学的分析。一种对策是根据微生物染色体、主要质粒和非组装转座子构建相应参考序列。虽然这种方法可以用来研究这些染色体外的序列,然而,很多可移动的基因元件存在有限的稳定性,以及在选择性压力下,染色体与染色体外的等位基因的不同可能存在严重问题。需要仔细分析一些微生物含有突变热点(聚簇突变)SNP,也包括 Taq 酶的自然错误率。对于真菌和寄生虫而言,它们的倍体(染色体组的数量)及复杂的或异源的等位基因可能会影响高确定性 SNP 的数量和质量,区分 SNP 对于分析和分型很有用。

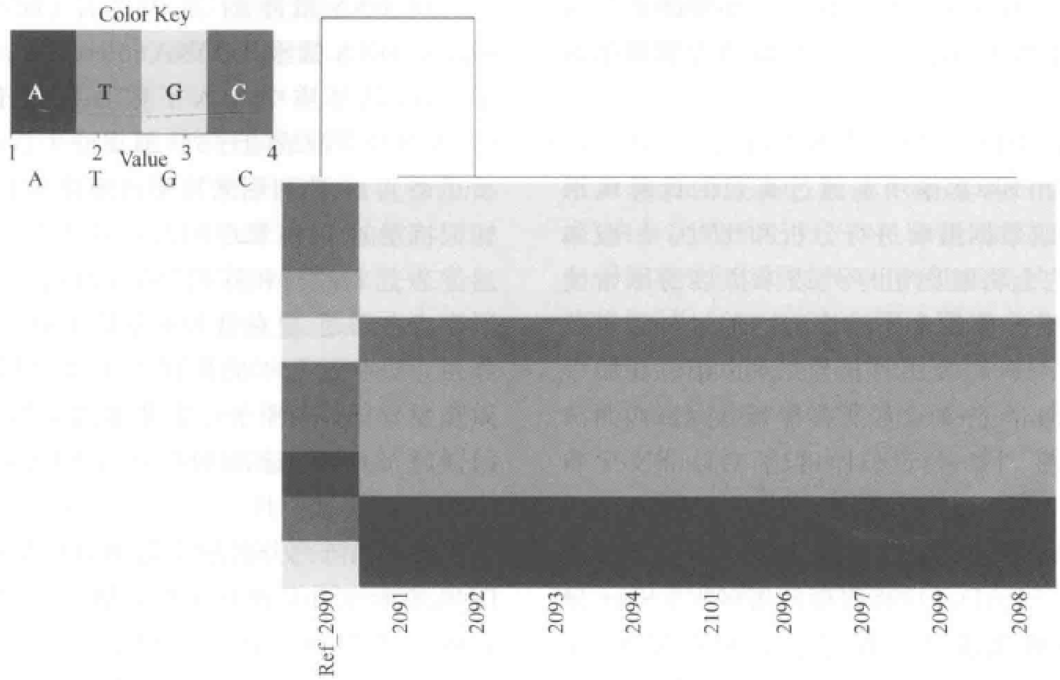


图 11-4 热图显示了同一暴发中 10 个 SETC O157 分离株之间的 SNP。为了阐明暴发中分离株之间的基因关系，图中将高质量 SNP 与最左侧的暴发流行株(索引案例)进行比对。暴发流行株中共检测到 9 个 SNP 位点，见彩插

8. 全基因组 MLST 分型 随着大量微生物基因组的测序、拼接和注释变得越来越廉价和实用，确定和查询大规模 MLST 或二进制分型方案(其中包括数十甚至数百种不同的基因或序列)成为可能。这种方法可以应用于微生物分型和特征研究，染色体外的显著差异可能与质粒、转座子、噬菌体或来自其他微生物的水平基因的迁移有关，并且毒性或抗微生物药物敏感性水平的信号表型可能也存在差异。公共的数据库项目和软件，如细菌分离株基因组序列数据库(BIGSd)(http://pubmlst.org/software/database/bigsdb/)，提供了细菌基因组分类和与许多不同 MLST 靶标系统比较的方法[127]。其他方法，如 BLAST(局部序列比对基本检索工具)得分率(BSR)，基于对所有可读框(ORFs)成对比较，提供了更多的两个基因组功能相似性的功能大体评估[128]。

尽管基于基因比对的分析方法作为应用 WGS 数据对菌株分型、分析细菌其他病原体特征的一个重要技术出现，当前，生物信息学分析及短片段下一代测序的局限性可能会影响其效用，尤其是在进行大规模比对上。技术的复杂性和分析的处理量，让高质量基因组装技术及可读框预测和解释一致性的可靠性面临挑战。细菌基因组草图可能包括数以百计的重叠群，因而对复杂的 MLST 过程的解释会一直受到重要的序列或阅读框架的断裂、复制，以及错误拼接影响。装配或基因预测算法的差异性可能会影响检测的通量和结果的解释，标准化的生物信息学方法和工作流程的建立至关重要，特别是对于序列数据库扩展到成百上千的含有许多不同等位基因的基因组。

可针对微生物基因数量的差异从数十个(核糖体 MLST)到数百个(延伸的 MLST)再到数千个[核心基因组 MLST(cgMLST)和全基因组 MLST(wgMLST)]进行基因分型。这 2 个分型方法中具有最高分辨率的是 cgMLST，指定菌种的所有菌株中大部分都包含这种分型基因；wgMLST 能够分型指定菌种的所有基因或接近所有基因(核心和附属基因，也称为泛基因组)。wgMLST 提供了高分辨率，适用于短期疾病暴发的调查；而 cgMLST 提供了长期的稳定性，适用于菌株种类的命名。另外，特异性基因存在或缺失，以及变异基因的二进制分型数据同样可为微生物的特征研究提供有用信息(特别是在与其他菌株分型方法相结合时)。已知耐药性和毒力标记组套的检测可为疫情调查或响应提供重要的信息，

而这些特性往往用来支持菌株鉴定和预测表型特征(如抗微生物药物耐药)[129]、传播动力学和患者预后判断。

9. k-mer 分析 最近,很多不同的基于 k-mer 的方法相继出现,其作用是通过高效的计算机平台对大基因组数据组套进行分析和比对。一般来说,这些算法会将基因组序列或未拼接的原始读序结果拆析为一系列 k-mer 序列或通过与后缀数组(suffifix arrays)的比对长度"k"的寡核苷酸序列。这时,k-mer 序列会经历排序、删除处理,并与其他 k-mer 序列集进行比对来识别变异(SNPs 和 Indels),用于矩阵和比对[130]。通常来讲,k-mer 算法是下游序列分析或拼接工作流程本质上的第一步。例如,SPADes 拼接程序使用多次 k-mer 分析来选择和优化集合参数[131]。序列存储库,如 NCBI,就是使用 k-mer 方法用于对上传的序列进行分类、特征描述和质量控制。例如,NCBI 病原分析途径(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens),即使用 k-mer 方法和其他分析方法在实时内比较和优化上传的序列数据。k-mer 方法可用来评估水平基因转移,基于已知的基因序列对 SNP 位点结果解释,调节等位基因缺失和进化趋同。它们很容易适应新的应用平台,如对复杂样本的宏基因组分析[130,132]。在疫情调查期间,基于 SNP 的 k-mer 分析是起始基因组比对和归并的良好工具,因为它可以快速提供可操作的菌株分析信息,并可筛选合适的参考菌株用于 SNP 分型,还可以评估整体序列质量,用于指导资源更为密集型下游生物信息学分析(这可能需要消耗大量时间才能完成)。

k-mer 树常和基于 SNP 种系发生的分析一起应用,不过要知道,2 种方法在功能上并不平等,k-mer 分析的速度优势是很重要的交换。与传统 SNP 分析方法不同,考虑基因前后变异位点及带有菌株特征的可读序列质量,基于 SNP 分析方法 k-mer 的侧重点在假定的 SNP 位点及周围序列的 10~12 个碱基,而不考虑质量分值。这些都是关键的限制因素,可导致不能有效检测靠近 SNP 的空隙,插入或缺失,进而导致低质量的测序和出现错误的测序结果。即便如此,k-mer 方法在速度和可操作性方面仍具有明显的优势,因为它们不需要进行序列的拼接或校准,并且可以同样地应用于整个基因组序列集和未拼接的短读序组合。

10. DNA 微阵列/基因芯片(DNA Microarrays) DNA 微阵列(DNA microarrays)是一种分子平台,其基质中加入了数百到数千的特异性 DNA 寡核苷酸或短序列[捕捉分子(capture molecules)]。该阵列用来检测待测样本 DNA 中荧光标记特定的序列(靶序列),经过或不经过扩增,再通过杂交来检测和阵列结合的待测 DNA。虽然因为成本问题、复杂性和通量的限制导致 DNA 微阵列方法在近几年的使用率下降,但固相和液相微阵列分析仍然用于一定范围内的诊断和分析应用,包括综合的诊断和抗微生物药物耐药性的确定。

固相微阵列分析通常是由目标基因组区域与 DNA 探针互补后沉积于玻璃载片上实现的(固态载体)。探针通常由寡核苷酸(9~100 bp)或 PCR 产物(100~1000 bp)合成。由于微阵列构成的灵活性受限,大部分探针在最终加入之前会被检测并且是有效的。这些探针可以标记由已知序列的参照分离株或基于有效序列的短间隔寡核苷酸扩增得到的 ORF[133]。另外,PCR 探针结合到内部由 2 个截然不同的荧光物质染色的微球上,得到一个悬浮阵列(液相载体),如 Luminex 平台的液相微阵列[134]。总的来说,平台的开发可能在许多方面都会有所不同,如探针含量、密度、沉积技术、标记、探针的杂交,以及样品的检测和分析。基于 ORF 的 DNA 阵列可以检测 ORF 的整体缺失情况,但不能检测小的缺失、点突变、限于基因间空间的缺失、基因重组、同源重复因子的缺失或基因的插入。短的寡核苷酸阵列对短核苷酸多态性的检测更为精确,但需要更多的探针,因而成本也较高。

几种用于病毒快速鉴定的微阵列已经开发出来,包括 ViroChip 和 GreeneChip[135-137]。这些阵列具备检测大量的病毒病原体的能力,并且可以快速鉴定未知疫源微生物暴发[138-139]。在某些情况下,阵列用来检测病毒的特定群体,如呼吸道病原体[140-142]。迄今为止,已报告最全面病原体检测阵列,来自于 Lawrence Livermore 国家实验室的一个团队。Lawrence Livermore 微生物检测阵列(LLMDA)通过使用 360 000 个 DNA 探针来检测超过 6000 种病毒和 15 000 种细菌,以及真菌和原生动物[143-144]。该阵列包含 2 个"发现"探针和"普查"探针。"发现"探针能够匹配一个科或亚科中

特殊的保守基因组区域；而“普查”探针是针对个体物种或菌种中独特的高度可变区，因此可以用于法医领域。

直到最近，DNA微阵列技术逐渐备受青睐，尽管价格昂贵，却是一个可用于广泛微生物鉴定和特征描述的平台。虽然DNA微阵列允许同时对给定样本中的数十万个靶进行检测，但这项技术成本高昂且缺乏灵活性，在许多公共卫生领域的应用效果不佳。每个样本的成本、样本检测通量和检测周期是至关重要的技术瓶颈，即使使用专用的微阵列打印设备，改变或调整微阵列的构成或布局来满足需求也不是一件容易的事。重现性同样是重要的考虑因素，对杂交比率模棱两可的解释和相似目标交叉融合也是限制这项技术的重要因素。尽管有对生物学工具的作用和标准与微阵列数据进行过比较[145]，但文献中缺少了对实验室间的重现性研究[146]。

虽然微阵列技术本身的使用率在下降，但最近的趋势显示扩增子微阵列探针技术的设立是一个更新的、更灵活的且划算的技术平台，如NGS或数字微滴式PCR。在许多情况下，引物和探针的设置在队列发展中广泛的有效，并且可适用于大规模等位扩增子测序的方法，如IonTorrent、AmpliSeq或Fluidigm。虽然这些技术不能达到与固相微阵列相同的靶密度，至少目前还没有达到，但它们的灵活性和可扩展性显著提高，可为成百上千的靶提供序列数据，这是与定性杂交相比的明显优势。

11. 质谱分析技术 近年来，在世界各地的临床和公共卫生微生物学实验室中，基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)系统的应用已经越来越普遍。与前几代复杂、昂贵且难以维护的质谱设备相比，这些新型的台式MALDI-TOF系统提供了简单、标准化的工作流程，可用于微生物种或属水平鉴定，其具有高通量、准确、快速和低成本的特点[147]。尽管一些概念验证性研究已经证实了MALDI-TOF应用于部分微生物菌株和亚种水平鉴别的可行性[148-151]，但标准化或概括性的方法还未开发出来，并且在多数情况下，目前单独使用时，MALTI-TOF仍只能鉴定到属或种的水平。一些商业公司尝试了质谱与其他分析技术相结合的方法。安捷伦Mass-Code PCR系统(Agileut Technologies)，使用了多重PCR试剂盒并通过大气压力、化学电离、四极质谱检测来对微生物进行鉴别或分型[152]。其他平台，如Sequenom MassArray平台(Sequenom Inc.，San Diego，CA)，基于标准化靶基因，利用PCR MALDI-TOF技术(通过单一引物碱基扩增)来解决成千上万SNP分析，此方法已建立了一套标准化靶基因用于相关性极高的流行相关株的分析[153]。然而，这些技术目前仍在开发中，其分型能力在大多数情况下还不能满足流行病学相关菌株的高分辨率分析。

二、应用

(一)分子监测

1. 分子血清学分型(molecular serotyping) 血清学分型是一种使用诊断性抗血清使特定的微生物表面抗原与已知抗体反应而检测到的分型方法。该方法绝对准确，但分辨力有限。尽管如此，血清学分型仍被证明对于许多病原体的流行病学分类非常有用，因此在迄今为止的70多年里，它一直为各类感染性疾病的主流监测方法。该方法较为烦琐，它需要高质量抗血清带来的实效性及扎实的专业知识来进行实验和解释结果。更方便、快速和可靠的分子替代物血清学分型方法正在开发中。这些分子血清学分型方法用来生成与传统血清学分型相近或完全相同的数据(为了不与历史数据断开联系)。上文已经讨论了弯曲菌的分子鞭毛蛋白分型(*flaA*型)、GAS的M血清学分型(*emm*型)和肺炎链球菌的荚膜(*cps*)分型。

沙门菌属中，目前公认的血清型有超过2500种[154]。已经投入使用的分子血清学分型方法有2种类型：①一种分子分型与血清型相关联的方法；②直接标记实际编码血清型的基因。在第2种情况下，O抗原基因在*rfb*基因簇中，鞭毛抗原的*fliC*和*fljB*基因分别编码1相和2相。分型方法与血清学分型相结合的例子有：MLST、脉冲场凝胶电泳、核糖体分型和rep-PCR[155]。分型方法之间的关系从来都不是完美的——在理想情况下，这些方法所决定的血清型应经过传统的血清学分型或针对编码血清型基因的分子血清型方法证实。关于后者，CDC开发了一种方法。通过*rfb*基因、*fliC*和*fljB*的PCR扩增与使用液态芯片进行扩增子检测相结合的方式，该

方法能够可靠地鉴定绝大多数与人类感染相关的血清型[156-157]。最近，这个方法由 Luminex 公司商业化。随着测序技术的进步，其直接由编码血清型基因的序列确定血清型的成本-效益比也越来越低[158]。针对 *rfb*、*fliC* 和 *fljB* 的方法直接与 Kauffman-White 方法相兼容，包含了所有沙门菌血清型的表型描述[154]，其结果将不需要传统血清学分型证实。

2. 病毒基因分型 分子流行病学方法已用于研究许多病毒的传播特征。最常见的方法是对病毒基因组包含基因多样性的特定区域进行序列分析，再进行序列比对和系统发育分析得到有效的结论。不同病毒的种类和基因型别在特异性的区域和"基因型分型窗"的长度上有差异。典型的"基因型分型窗"包含衣壳蛋白和变异度高的区域。病毒血清型分型方法的使用优先于用测序数据分析基因型的分子学方法。对于许多病毒组，新的基因型分型结果最大程度上设计与血清型分型结果一致。通常对病毒衣壳蛋白的基因编码区或表面糖蛋白测序而实现，因为这些蛋白有更多的抗原性。对一些病毒的衣壳蛋白区域进行测序的另一个优势是因为该区域不易发生重组。例如，小核糖核酸病毒 VP1 的亚单元用于分型鉴定 100 多个肠道病毒[159-160]，因为非衣壳编码区经常发生基因重组。变异度高的区域同样用于对确定的病毒进行分型，如麻疹病毒的 M-F 基因间区除了用于血凝素(H)和核蛋白(N)基因的测序窗口外，还用于高分辨率基因分型[161]。

许多病毒用传统的基因分型窗来进行分型。基于分类学上的目的，国际病毒分类委员会正式将病毒分为科、属、种和型。基于分子流行病学的目的，通过与已建立的参考毒株进行比较，可以进一步(非正式地)将病毒分为支簇、基因组或簇。特别是 RNA 病毒具有高突变率，这增加了基因组中序列变异的数量[162-163]。

将病毒基因型与疾病联系起来是临床微生物学的一个重要应用。甚至在同一种病毒中，某些基因型的病毒致病性也比其他基因型的强。例如，人乳头状瘤病毒(human papillomavirus，HPV)有 100 多种型别，但仅有 15 种鉴定为高危型(16，18，31，33，35，39，45，51，52，56，58，59，68，73，82 型)[164]。肠道病毒(小 RNA 病毒)有 100 多种型别，但疾病范围包括急性弛缓性麻痹、无菌性脑膜炎、脑炎、新生儿脓毒症样病、皮疹病，以及呼吸道和肠道疾病。从临床角度分析，区分低风险或高风险型基因型和不同型别关联的疾病可为疾病的干预提供重要的信息。病毒种类的基因分型在新发感染病的调查、进化和传播中是至关重要的一部分。

3. 聚类分析/暴发调查 用于全社会常规监测的分型方法必须是快速、有高分辨力、重现性好且易于建库的，以对疾病案例进行聚类检测并协助疫情调查，确保出现的目标病原的态势可轻松追踪。分型结果通常是决定是否需要启动疫情调查的唯一可用信息。在这种情况下，病例的确认需高度特异，即分型方法的分辨力应很强，以防混入与暴发无关的患者，因为他们会造成流行病学调查的混乱。为达到该目的，最合适的分子生物学方法是 PFGE、MLVA 及高分辨力的 DNA 阵列，这些方法在不久的将来都可能会被 WGS 取代。这些方法经常与低分辨力的传统方法和分子方法联用，如生物分型、血清分型、噬菌体分型、耐药谱和(或)质粒分型。

PulseNet 是监测食源性疾病的国家分子分型网络，也是网络实时监测社区感染性疾病的一个最好例子[165]。在分型网络，所有参与者都使用同一种方法比方法的选择更重要，只要首选方法能够做出充分的特征性分析。在 PulseNet 上，20 年来首选的分型方法是 PFGE，但是该方法逐渐由 WGS 取代用来分析分型结果，使用 cgMLST 和 wgMLST 来分型[166]。相比于 PFGE，WGS 更为敏感、更具有特异性，能够有效地检测和调查疫情。例如，在美国，实施 WGS 后的前 2 年内检测到了李斯特菌病大规模暴发，到 2013 年其检测数量增加了 50%，且被解决的疫情增加量超过 100%[118]。

对于医院和其他机构与社区，所使用的监控和研究暴发的分子方法要求不同。它的规模相对较小，通常仅有一个实验室参与，并且暴发流行经常由人传人病原或者环境中持续存在的病原引起。这些菌株在暴发流行过程中会发生进化，同时出现变异的亚型。用于社区监测的方法也可用于这些院内暴发流行，且只要实验室内重现性足够，实验室间重现性不理想也可以使用。PCR 方法对于短期监测具有成本效益，并且可用于描述表型方法或其他分辨率低的方法对疫情研究的结

果特征[167-169]，但不久的将来可能会由WGS取代。

分子流行病学技术、标准案例分类和报告的结合，提供了一个描述多种病毒传播途径的敏感方法。特别是序列数据的分析可以帮助确认病毒的来源或为未知源头病毒的来源提供线索。分子数据可用于在各种案例和暴发间建立流行病学联系。不同病毒引起的疫情采用不同的分子方法进行检测调查。检测调查疫情需要考虑的重要的因素包括特异性、敏感性、重现性、周期长短、成本和操作难易度。检测周期的长短是对疫情快速应答的至关重要的因素。许多标准方法涉及病原体的分离，这需要相当长的时间。相比之下，直接对临床标本进行检测主要采用PCR或RT-PCR方法，然后进行Sanger测序，是加快疫情调查的主要步骤，并且新的NGS技术的应用已经有提高。使用NGS直接从临床样本中检测病原体进行诊断，仍需要充分评估其检测的敏感性和周转长短，但该方法在特殊的情况下已经证明是有用的[170]。

医院和公共卫生实验室是疫情检测的前线，由于多重PCR系统中能够检测到一组疾病特异性的病原体，因此许多机构已经基于症状监测投资了这样一个工作平台，如BioFire公司的FilmArray、Luminex公司的xTAG和赛默飞公司的TaqMan阵列卡。目前，这些症状检测系统仅可检测到病原体的存在，而不能检测到病原体特异的基因型。

对于具有高度传染性的病毒（如麻疹病毒），其传播可以发生在任何地方。当标准案例调查未能确认源头时，可通过分子技术来确认感染的来源[171]。

4. 溯源 溯源（source attribution）是研究感染性疾病不同来源带来的负担大小的流行病学科。严格地说，疫情调查属于溯源分析，但该术语常用于更广泛意义上的暴发性或散发性疾病。分子方法可用于研究微生物株的地理分布、来源和传播，这一点将在下一节进行讨论。

使用微生物学方法进行溯源正获得越来越多的关注，特别是在食源性疾病的研究中，可预估最大的公共卫生问题在食品生产链上是如何产生的，从而使决策者们通过这些预估信息来决定优先在何处实行控制最有效。用于溯源的分型方法可以产生新的亚型，这些亚型在人类感染的可能来源中不均衡分布。当这一点与相同亚型在患者群中的分布信息及人类暴露在每一种源头的比例相结合时，可以估计人类疾病不同来源的负担大小[172]。这种方法被英国引入并主要用于鸡肉中空肠弯曲菌（Campylobacter jejuni）及结肠弯曲菌的监测，随着反刍动物逐渐成为另一种重要来源[173]，其也用于反刍动物中空肠弯曲菌及结肠弯曲菌的监测并且指导干预措施[174-175]。

这种分类方法的局限性在于它只适用数据库中存在的菌株，即如果研究菌株还未纳入数据库，则不能得到溯源。只要用于溯源的分型方法可清楚地区分不同来源的菌株，它就不需达到用于暴发调查方法的分辨能力和重现性水平。如果选择非必需高分辨率方法，则会增加数据分析复杂性。对于空肠弯曲菌属，管家基因MLST方法对该疫情调查最有效，且在未来的几年，该方法将可能作为用于溯源的主要方法[176]。理论上，对溯源而言，提供系统发育信息的分型方法比不提供这些信息的方法更有用，因为从每个源头收集的数据都不可能囊括一切。即使一些分型信息丢失，这些数据依然有用，因为系统发育学上互属亲缘的菌株更可能产生于同一来源。

5. 感染性疾病的动力学

（1）病原进化：分子技术为人们了解病原体进化做出了巨大贡献，但对这些研究详细说明已经超出本章的范围。将它用于监测各种病原体循环菌的分布及抗原位点的稳定性分析，这些位点对于诊断疾病、研制疫苗并评估抗微生物药物敏感性至关重要。

改进的计算机分子生物学资源及新的分析方法，如Bayesian进化分析和样本树（Bayesian evolutionary analysis and sampling trees，BEAST）[177]可结合样本数据，并且可实现从序列数据到种群的进化动力学的推断。这些方法统称为系统发育动态研究（phylodynamics）[178]。应用这些方法可根据传染性病原体的序列信息来推断随着时间推移而变化的病原体传播模式。埃及丙型肝炎病毒（hepatitis virus）序列分析显示，在1930年和1955年，因进行抗血吸虫治疗时使用未消毒针头，使得丙型肝炎病毒感染例数呈指数增加[179]。类似的研究还有在20世纪90年代末，伦敦的HIV偶然传播事件[180]。物种进化评估的比较方法，如同义替换和非同义替换率（dS/dN ratio），即每一同义替换位点发生的同义替换的总数与每一非同义替换位点

发生的非同义替换的总数的比值，可用于测量病原体的进化压力。听起来很有希望，但使用分子钟和地域数据的方法对进化动态进行调查必须考虑到数据和模型的假设性和限制性。为了正确地执行进化动态分析，必须理解潜在的抽样偏差和对特定分析序列窗口的进化率的假设。

遗传漂变(genetic drift)，即突变随时间的积累，遗传漂移(genetic shift)，即基因的重组和重配，两者均是病原体进化的重要机制。目前的分子技术，从 WGS 再到 NGS，能够更好地检测遗传漂变和遗传漂移，并能更好地鉴定新发物种。重组是交换 2 个不同类群间的整个核酸分子。在公共卫生领域，能够推动带有分段基因组的人类病毒发生巨大的进化，如流感病毒、轮状病毒/呼肠孤病毒、布尼亚病毒及沙粒病毒[181-184]。分析这些片段的组合，以重建重组事件的过程，是一个重要的分子流行病学工具。例如，重配分析方法已经解决了 1918 年暴发的 H1N1 流感、1957 年暴发的 H2N2 流感、1968 年暴发的 H3N2 流感和 2009 年暴发的 H1N1 流感。

(2)地域传播：分子技术已在全球范围内用于鉴别传染性病原体来源，也可用于检测病原体的传播。分子技术的敏感性依赖于监测活动的水平及全球遗传信息数据库的有效性。1999 年，西尼罗河病毒传入美国，通过序列分析识别西尼罗河病毒来源，追踪该病毒在整个国家的传播路径[185-186]，同时还追踪艾滋病病毒多种遗传变异的全球传播轨迹[187]。

(3)消除地区性持续传播：对疫苗接种预防的病毒性疾病进行分子监测尤其有益，它可以观察某个特定国家或地区病毒基因型随时间发生的变化。结合标准的流行病学数据分析，这些分子监测信息有助于记录地方性病毒传播的中断过程，并且提供了一种衡量疫苗接种计划是否成功的方法。

麻疹病毒的分子生物学特征为评估麻疹防控计划有效性提供了一个有价值的手段。目前，已发现 3 种不同的麻疹基因型分布模式。第 1 种模式出现在某些仍存在局部地区麻疹传播的国家，大部分病例是由地区性基因型的麻疹病毒所引起。因此，本地基因型及其他基因型同时流行的情况也存在。第 2 种模式出现在那些已经消灭麻疹的国家，出现极少数病例，是由多种不同基因型的麻疹病毒引起，这些基因型反映了输入性病毒的不同来源，同时说明本地区没有麻疹流行。第 3 种模式出现在麻疹得到了很好控制的国家或地区，但因未能维持疫苗的高覆盖率，易感人数在逐渐增加。因此，再次输入的麻疹通常会导致大的暴发流行，且病原体具有序列几乎相同的单一病毒基因型[171,188,190]。

(4)新发感染与人畜共患病调查：分子方法有时对发现新病原至关重要，尤其是病毒，它可确定该病原体是新出现的还是通过原有病原基因重组产生的。例如，冠状病毒(coronaviruses)有与其他冠状病毒重组的能力，也可将宿主细胞的某些基因整合到自身基因组内[191]。对引起 SARS 的冠状病毒(coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome，SARS. CoV)进行全基因组测序分析证实，这种病毒是一种新型冠状病毒，而不是由上述冠状病毒重组而来[192-194]。2012 年，对引起急性呼吸道症状的新型病毒(HCoV EMC 或 MERS-CoV)进行鸟枪法测序结果显示，这个病毒是乙型冠状病毒(betacoronavirus)的新变异株，它与蝙蝠冠状病毒(bat coronavirus)密切相关，而与 SARS-CoV 关系不大[192-194]。

使用分子流行病学已经极大增加了对一些新发病原体来源的理解，如寨卡病毒[195]和埃博拉病毒[196]。最著名的分子流行病学研究之一是关于艾滋病毒"0 号患者"的报告，该报告将艾滋病毒 1 型传播与同性恋男子联系在一起[197]。然而，最近对档案里的全基因组序列分析已经推翻了"0 号患者"的假说[198-199]。

在较长的时间范围内，可以利用遗传信息和其他证据来确定导致人畜共患病的外溢事件。分子流行病学的研究已经用来理解过去 30 年内流行的人畜共患病。例如，HIV-1 起源于黑猩猩的猿类免疫缺陷病毒(SIV)人畜共患病[200]，HIV-2 的来源是黑白眉猴的 SIV 人畜共患病[201-202]，果蝠是埃博拉病毒的宿主[203]，骆驼是 MERS 冠状病毒的宿主[204]，禽类和人类基因组重组导致了 1918 年的 H1N1 病毒、1957 年的 H2N2 病毒和 1968 年的 H3N2 病毒的流感暴发[205]。2009 年的 H1N1"猪流感"病毒发现是一种三元重组病毒，与人类、猪和禽类的流感病毒株有相同的基因成分[181]。

6. 疫苗接种 减毒活疫苗可用来控制一些病

毒性疾病。在某些情况下，这些疫苗会出现类似野生型病毒感染引起的症状。当暴露于疾病的风险很低时，临时接种疫苗可以鉴别出疫苗相关反应。然而，当疫苗接种作为暴发反应的一部分时，很难区分疫苗反应与自然感染引起的症状。由于血清学技术敏感性低，无法区分接种疫苗或自然感染产生的抗体，故病毒的遗传特性通常是明确区分该病例为疫苗相关反应还是野生型感染的唯一方法。当然，该方法需从疑似病例中收集合适的病毒学检测标本，且这些序列信息需可用于分析疫苗株。

如上所述，分子方法可以清楚地识别疫苗反应，使我们了解到减毒活疫苗的安全性。此外，分子技术在对病毒减毒活疫苗上市评价方面有重要作用。遗传特性用于监测疫苗实际作用的稳定性并明确识别疫苗反应。举个例子，PCR 和 RELP 可通过分析 Oka 疫苗株中的野生型水痘-带状疱疹病毒来监控水痘-带状疱疹疫苗的安全性[206]。一些病毒有重组及重配基因组的能力，在这种情况下，WGS 是分子流行病学研究的重要手段。世界卫生组织根除脊髓灰质炎使用的减毒活疫苗可以在人体肠道内复制，并在免疫后数周内排出体外。在疫苗接种过程中，若减毒活疫苗株发生变异恢复毒性，可能会导致接种者发生疫苗相关的麻痹性脊髓灰质炎，或者产生具有传播性、神经毒性的再生疫苗衍生脊髓灰质炎病毒株，这种病毒株与脊髓灰质炎的暴发有关[207-208]。疫苗衍生的脊髓灰质炎病毒包含由疫苗株和其他脊髓灰质炎病毒或肠道病毒(enteroviruses)重组形成的嵌合基因组[208-209]，这些变异只有通过全基因组测序才可检测到。在疫情应对期间迅速发现麻疹疫苗反应对避免不必要的公共卫生干预至关重要。麻疹疫苗株鉴定的标准方法是 Sanger 测序，但最近疫苗特异性的 RT-PCR 试验更多应用于鉴定疫苗反应，且检测时间小于 3 h[210-211]。

在某些情况下，由分子方法监控病毒和细菌得到的数据也用来决定疫苗研制的最合理方案。如果基因改变伴随着抗原性变化，则菌株的地域分布可能会影响疫苗的有效性。因此，对于抗原特性可变的病原(如轮状病毒和流感病毒)，密切监测与疫苗接种人群相关的菌株很有必要[212-214]。

(二)法医微生物学

有时，如果怀疑故意行为或犯罪所为，感染性疾病事件需要进行犯罪调查。历史上，HIV 播散是人为因素所导致，因感染者故意[215]或疏忽[216]造成病毒播散，同样，炭疽可通过信件传播[79,217]。每年都会发生多起食源性疾病的暴发流行，其中有一些就是食品供应商"故意"污染所引起[218]。当监管者、非专业人士、法官和律师必须决定感染事件是否为犯罪行为所致时，法医分子流行病学就开始发挥其作用。原则上，除非刑事调查中必须证明感染事件与其来源的关系，刑事微生物学调查与暴发流行调查本质上是没有区别的。在暴发流行调查中，一旦确定为公共卫生行为时，通常会采取预防原则，因为该调查研究的目的是尽快阻止疫情传播，这与刑事调查工作正好相反，在罪犯被推定无罪前是不会采取预防措施的。分型方法可以量化两种微生物菌株的相关性，因此，它要优于那些不直接产生量化信息的方法。由于大小相同的 DNA 片段可能拥有完全不同的序列信息，故非特异性探针方法对刑事调查来说是不合理的。例如，若 2 个分离株是完全相同的，那么通过 PFGE 方法无法鉴别，即该方法不能区分它们。相反，如果已经知道相关微生物群等位基因的致病情况，就可以通过特异性探针方法对观察到的差异进行量化。如果有生物武器在大规模制造过程留下的基因特征的证据或基因工程在基因组序列中留下的遗传印迹，那么使用 WGS 方法对这些基因学证据进行鉴定可能会改进对恶性故意事件的检测能力[219]。

三、分型方法的选择、验证和结果解释

(一)方法选择

恰如通常所见，分型方法的选择仅仅遵循方便原则，尤其是对实验室而言仅仅考虑方法的可操作性，导致了大量对微生物的研究中使用了不恰当的分型方法[1]。在选择分型方法时，首先应考虑流行病学研究背景，如分型数据应该解释什么问题？一个用于长期监测的方法对院内感染暴发流行的短期调查可能不适合。此外，还应仔细考虑目标病原微生物的遗传构成，包括克隆性、传播方式及暴发潜力。在不久的将来，方法的选择可能不再是问题，由于 WGS 具有通用性和灵活性的特点，因此，可能广泛用于几乎所有分子流行病学的应用。

种群"克隆性"的影响因素 分离株基因型和表型相似性比来自随机样本,或种属相同但流行病学不相关的菌株的预期相似性高,意味着分离株之间有克隆相关性[1]。对遗传单形性(monomorphic)病原最简单的解释是由于最近遇到的瓶颈,即遗传多样性被废除,使得所有现存生物的祖先群体规模在急剧减小。导致这个瓶颈的原因可能是曾经发生过的单一遗传事件,如鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)祖先群体由于获得2种质粒而引起生态位(ecological niche)改变[220]。STEC O157的案例显示可以用源库(source-sink)进化动力学解释克隆性[221-223]。根据这个理论可知,微生物突变体主要寄居在储蓄宿主(传染源如牛)中,这些储蓄宿主并不是致病原,但突变可以呈现小亚群表型,导致偶发的宿主(无症状携带者,如人类)损伤。或者,有人认为,基因突变所赋予的选择性优势使STEC O157中的特定菌株可以在牛体内快速生长,从而对人类造成不良影响[223]。另一方面,对一些宿主限制性病原如伤寒血清型肠炎沙门菌来说,来自宿主和环境的选择性压力相对较小,因此,它们不会通过点突变、基因重组或新序列获取而发生多样性变化[224]。最后,抽样误差也可能导致种群克隆性的出现。从系统进化树的某一部分抽样会忽视种群中存在的很多变异,同时会将种群研究以外的所有分离株划分为单一型别[225]。为了能够充分辨别克隆微生物,如果WGS不可利用,针对快速演化的遗传因子如VNTRs或SNPs的分型方法通常会作为首选[226-227]。对某些微生物而言,使用多种技术如PFGE和VNTR分析可以获得最理想的结果[228]。

(二)方法验证

一旦选择了合适的方法,必须对其进行严格验证以确保它符合第一章讨论的标准,这包括使用源于流行病学研究的一个菌株和分离株群进行验证。用于地方性研究的技术需从同一地点采集菌株来验证,而用于全社会范围监控的方法需要由反映整个社区多样性的菌株进行验证。当一种分型方法已经在已知流行病学研究中被验证过时,仍需要在不同情况下接受验证,应用前,在新的背景下进行验证是很有必要的。此补充验证可不同于原始验证,这主要取决于2次研究背景的相似程度。

不同于微生物分离鉴定的方法(供某一实验室使用),用于建立多中心参比实验室数据库的方法需仔细进行测试、评估和验证。所有方法的验证都需要经过4个阶段:初步开发、内部验证、外部验证和实行评价,前2个阶段经常会重叠。此外,在新方法实施前需要建立质量保证和质量控制(QA/QC)。

初步开发的任务是确定最佳条件或参数,以确保这个方法是有效、可重复,并且对所有菌株来说,都可以产生具有高分辨力、流行病学相关的数据。在最初阶段的种群研究中,通常会选择10~50个分离株来验证此方法的可行性。

在内部验证阶段,参与此方法开发的人员不应该实施检测,以确保在那些无经验的实验员操作时此方案的有效性。分离株检测已经扩大到包括研究种群的全部遗传多样性,同时,它还应包括散发或暴发相关的分离株,以便于检测此方法的真实分辨力及流行病学相关性。此外,还应该检测同一种属的重复分离株及单一来源暴发流行的多个分离株,以评估该方法的可重现性和稳定性。这个检测过程通常需要100~500个分离株。如果某个微生物存在"金标准"的分型方法,需要选择已知亚型菌株的分离株来评估新方法的性能。

在外部验证阶段,通常由5~10个外部合作实验室来验证该方法的有效性及简便性,并且最好有不同级别分型领域的专家来评估不同类型或品牌的分型设备和试剂的性能。开发此方法的实验室应选择10~50个分离株对其进行评估,在该阶段,也应对实验室间的可重现性进行评估。有时,外部验证还应包括高达50个分离株的前瞻性或回顾性检测,而这些分离株来自于每个实验室自己收集的菌株。

当这些阶段都成功完成后,该方法才可以实施。而且,即使该方法已经实施,也应该定期评估其性能,以便于检测出初步验证时未检出的问题及新出现的情况,如引进新品牌商业化试剂所带来的影响。

质量保证/质量控制 为了生成持续高质量和可重复的数据,任何分子分型技术在实施前都应该有质量保证措施。至少,分型技术只能由经过培训且操作过此技术的人员来完成。此外,应建立书面的标准操作流程。为了检测程序问题,

质量控制的方法应该含在工作流水线中，如 DNA 模板或 DNA 序列库的定量和用 PCR 法进行阴阳质控品的试验。实验室网站中的分型参考库系统应包含室间质量评价（external quality assessment，EQA）程序，其包含必要的初始认证和每年的性能检测。EQA 系统应包括实验室和数据分析程序[229-230]。

由于 NGS 每次运行过程中都会产生数十亿的序列，因此会存在固有的序列污染风险。虽然使用 NGS 技术能广泛性检测病原体，但容易造成样本处理的污染、实验室操作中的污染、试剂的污染，运行间的污染和运行中条码"溢出"的污染。例如，一些 MiSeq 平台用户遇到过序列数据试验间的污染，可以通过在序列运行之间执行氯化物清洗来缓解或完全解决这个问题。在相同的测序分析中，对高滴度靶标和低滴度靶标进行同一个测序试验时可能会导致从前者到后者的读数发生倾斜，甚至实验室试剂可能是污染的来源。一种最初在肝炎患者[231]中检测到的小型 DNA 病毒是核酸提取过程中使用的二氧化硅柱受到污染的结果[232]。此外，一些商业 RT 制剂可能含有小鼠逆转录病毒 RNA，可能产生于制造过程（T. Ng，未发表数据）。

以指数方式扩增核酸的分子技术，如 PCR，也容易受到污染，特别是巢式 PCR。例如，小鼠白血病病毒（murine leukemia viruses，MLVs），包括嗜异性的 MLV 相关的病毒，与慢性疲劳症有关；然而，这些发现最终被驳倒[233]，基于压倒性的证据显示最初的结果是由商业化的实验室试剂污染的序列产生[234]。

为了在对纯培养物进行测序时排除实验室衍生的污染，在进行 NGS 后应常规进行运行间及运行内的分析，以确定潜在的污染序列。另外，阳性和阴性对照推荐用于宏基因组学的应用中。

(三)数据解释

分子流行病学的基石之一是一个假说，即通过分型反应流行病学的亲缘性来观察微生物的生物学亲缘性。然而，这个关联还不太完美，基于这个原因，不能单独依赖分型信息。无论何时解释生物学的分型匹配，思考如何和所有其他可利用的信息合理相匹配很重要。应考虑流行病学背景和其他可用数据，例如，相关的人口统计和其他流行病学信息及其他分型信息、如生化表型、血清型、噬菌体型、抗微生物药物敏感性情况及存在的致病因素；无论何时都应尽可能避免对单一参数的依赖。了解分型方法还应考虑数据质量、微生物多样性、存在亚型的历史背景等[235]。

1. 数据质量　即使认真遵循标准流程，也可能出现错误条带。因此，了解这些技术的特性是很重要的，以便于认识和纠正错误。这样，数据库管理员的作用就相当重要。在 PFGE 技术中，限制性内切酶水解不完整产生的条带模糊，水解后产生亚带（如 1 个粗的条带和 2 个细的条带），在同一水平上很难鉴别[235]。在以 PCR 为基础的方法中，如 RAPD 和 rep-PCR，条带强度的差异是个重大问题，并且在 MLVA、PCR 和片段分析中一些错误，如减 A、辅峰和荧光移行，可能使结果解释更困难[236]。同时，Sanger 测序法应常规进行质量控制，包括操作和软件使用[如 Phred/Phrap，(http://www.phrap.org)]。当对一个新的基因进行确认时，需要将基因测序的排列结果上传至数据库[237]。

下一代 WGS 数据的质量可以基于原始读取（例如，每个碱基序列的质量、序列长度的分布、GC 偏差和序列覆盖率）或组装（例如，$N50$、重叠群的数量和组装的长度），以及使用软件内置的测序系统或外部的软件包，对各种质量指标进行评估。必须认识到，基因组组装的质量反映了所使用的测序技术，以及用于组装和注释的分析软件的质量[238]。关于多家实验室的参考库系统，所有参与者严格遵守相互同意的阈值是至关重要的，如最小序列覆盖率和质量分数。否则，下游分析可能会受到影响[112,239]。下游序列的质量和完整性的分析需要进一步评估，通过监测参考基因组的高质量 SNP（high-quality SNP，hqSNP）的比对分析和 wgMLST 分析等位基因的数量[293]。上述提及的一些参数可能同样会提供造成序列污染的线索。此外，分类法检查应该包括在常规的质量评估中。

2. 物种多样性　对 2 种分离菌亚型间差异（或缺乏差异）的最佳解释很大程度上依赖于微生物型别的变异性。大型数据库应提供充分的数据对微生物多样性做出合理的解释。如果一种微生物显示较小的多样性，假定它们密切相关，甚至无法区分，那它们可能同源。在这种情况下，就应考

虑用其他可用信息或者使用其他分型方法作为辅助手段。如果这个微生物显示潜在的多样性，则必须考虑非克隆种内存在亚克隆种群。另一方面，一个物种有多样性，则任何比对差异都有意义。

3. 流行病学背景 从流行病学的角度上来看，如果分离菌没有继续传播，则表现为点源暴发，因为暴发菌株没有时间发生遗传改变，故仅观察到很小的差异。相反，当分离菌正在传播时，如长期的医院或社区暴发流行，菌株从一人传至另一人，或动物源性的暴发，就会出现更多的变异。此外，在一次暴发中所看到的变化取决于分子方法中遗传标记的稳定性。快速进化的遗传标记即使在短期的暴发流行中，如 VNTRS，也会发生轻微改变[82]。在对已知暴发流行的调查研究中显示，当前的暴发模式与最初的暴发模式略有不同，有亚模式或变异出现。然而，当实施集群或暴发检测的监控时，接受这种变异可能会误导流行病学调查[240]，尤其是当其中的一个变种代表一个常见模式时。

考虑流行病学和环境研究与实验室结果如何匹配也很重要。许多微生物存在各种常见亚型，无法区分的单一亚型不能明确证明流行病学关系，因此 2 个个体很可能感染不同来源的相同菌株。另一方面，显然不同的亚型并不能证明分离株在流行病学上无相关性，因为不同的菌株可以引起相同的暴发流行[241]，而且有些菌株包含遗传元素，如噬菌体可以不稳定的方式整合到基因组中，因此可能会影响由同一生物体纯培养筛选出的不同克隆株的亚型[242]。因为这个原因，会使用高分辨率的方法，如 hqSNP，但是建议先排除可移动的基因元素并重复分析区域，因为这些可能会造成调查中的系统噪声。对数据间的关联并不是很明显的，利用 hqSNP 和 wgMLST 等 WGS 数据分析的方法来设置阈值，并利用层次方法进行聚类检测可能是有益的。

四、分子流行病学库

国际旅游、移民和食物贸易是微生物全球播散的主要因素。因此，目前迫切需要建立菌种的标准化分类命名和相关的流行病学信息的国际化数据库。建立这种数据库，需要依赖于标准化的分型方法和常规实验室的 EQA 流程，确保所有参与的实验室可持续比对数据。

(一)菌株目录

菌株目录数据库主要在公共网站上获取，一些网站进入权限有所限制。数据库的主要用途是使菌种亚型的分类命名标准化，方便简单的数据共享。大部分是有组织的，但是经典的分类数据库包括罕见的流行病学或地域的信息，因此，对实时流行病学监测而言并非很有用。根据菌种不同，应选择不同的准则建立数据库菌株目录法，从没有标准(MLVA)至适当标准(spa 分型)。

人们最广泛熟知的菌种数据库有 3 个，即 MLST 数据库、伦敦皇家学院(http://www.mlst.net)[237]、牛津大学(http://www.pubmlst.org)[246]。在 MLST 网站和巴斯德学院网站上，有菌种特异性信息，包括有一些有限的流行病学数据，可以在每一个介绍种类的网站上找到；然而 pubmlst.org 软件可以使多客户数据库访问单一的菌种特异性数据库，以便于保持信息的机密安全。每一个种特异性数据库包括了所有 MLST 位点的等位基因序列，通过数据库管理员指出新的等位基因的数量和序列。网站提供了一种聚类的工具，可以在数据库中将待检菌种和另一些菌种进行相关比较研究。

明斯特大学医院与罗伯特科赫研究所(Wernigerode, Germany)合作建立的网站——SeqNet(http://www.seqnet.org)，就是一个基于非 MLST 菌株目录数据库示例。SeqNet 起初是来自 29 个欧洲国家的 60 个国家参考实验室和大学实验室的一项倡议，目的是共同建立病原微生物基因序列的网络[247]。SeqNet 目前只有一个通过服务器建立的金黄色葡萄球菌 spa 分型基因数据库，无法扩大到其他微生物的序列。

MLVA 的国际数据库在 10 年前建立起来。由法国奥赛大学建立的 MLVAbank(http://mlva.upsud.fr)，其微生物的数据库信息来源既有官方的也有私人的[88]。公共数据库来源于已公布的数据，有些则是从不同团队出版的文章中归纳得到的。由于不同的团队所使用的 VNTR 标志物并不总是相同的(目前尚未标准化)，不同的数据可用于不同的分离株。因为有时不同团队会将不同的引物用于相同的标志物，并且不同的毛细管

电泳平台之间具有差异性，所以尽管他们都将重复拷贝数上传到 MLVAbank 中，数据也并不总是直接可比。

结核病数据库（https://omictools.com/tuberculosis-database-tool）是一个集成数据库，为结核病的研究提供有用的资料，其内部储存着结核分枝杆菌的注释的基因序列数据、体外试验得到的基因芯片，以及 RT-PCR 的数据和感染 TB 的组织[248]。结核病研究者在发表论文之前可将实验数据存入数据库，使数据在文章正式出版前可进行分析、注释、可视化及数据的共享，而后数据在作者提出请求或发表后可公开。数据库管理员也将积极搜索包含有关 TB 内容的出版文献或收集基因芯片数据，然后从研究者处获得原始数据并上传到数据库中。

NCBI 网站中的 Genome Trakr 数据库，包含了原始序列数据和菌株来源的元数据，食物地域性的来源及环境中的沙门菌、李斯特菌、大肠埃希菌、志贺菌及弯曲杆菌。该数据库的目的是作为一个归属数据库，在暴发调查期间，可以比较来自食品和环境中的前瞻性菌株，为菌株可能的来源提供线索[249]。Genome Trakr 网站的美方参与者包括州、联邦、学术、商业实验室和一些国际合作伙伴。该网站由美国 FDA 管理，并参与 NCBI 病原检测线用于 hqSNP 集中的日常数据分析，网址为 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/[250]。

(二)监管库

监管库是限制访问的专业数据库，它可以实时分享菌株相关的分型数据及详细的人口统计信息。这个监管库的主要功能是快速检测并定义疾病类别，以发起和支持旨在追踪疾病来源及限制暴发范围的流行病学研究。通常，实验室向监管库传输数据时，应遵循高标准化的协议及遵守严格的 QA/QC 条例，以保证数据的高质量和可重复性。

PulseNet——美国国家和国际食源性疾病监测网络，是监管库最成功的例子。美国 PulseNet 建于 1996 年[20]，随后在加拿大、亚太地区、拉丁美洲、中东、欧洲也相继建立类似的监测网络，最近在非洲也建立了[251]（www.pulsenetinternational.org）。参与实验室可及时应用 PFGE 检测临床样本和食物样本的所有食源性微生物。当地发生的食源性疫情可以经高级订制的软件分析，并通过网络将数据上传至每个地区的中心数据库。数据库管理者需要确认疫情水平，根据标准化手册对其命名，并与过去 60 天（对李斯特菌属来说是 120 天）已经上传数据库的疫情相比较。如果检测到一些无法区分的分离株，该系统会提醒流行病学专家。到目前为止，国际 PulseNet 的工作重点是建立网络的基础设施，但最终每个区域网络都能登录到其他国际网络的服务器，查询到与其所研究病原体亚型相匹配的数据，如果发现了匹配数据，即可从匹配的分离株模式中获得流行病学信息[251]。美国 PulseNet 和加拿大 PulseNet 已经开展这类合作。国际 PulseNet 是取代传统的参考表征方法的过程，如血清型分型、毒性和抗生素耐药性分析，PFGE 分型和 WGS 技术。这个设想是使用标准化的 wgMLST 方法，利用公共区域[166]的辅助等位基因（curated allele）和菌株命名数据库，从序列中提取参考和分型信息。美国 PulseNet 同样致力于释放非常有限的元数据的原始序列到 NCBI 网站上。分析的数据和更详细的元数据将会收藏在限制访问的数据库中。

其他类似 PulseNet 的监管库包括美国的 CaliciNet 网络[252]和欧洲食源性病毒（FBVE）网络[253]，主要监测诺如病毒。这个病毒学网络主要进行 DNA 序列分析，一系列病毒特异的监管库已经建立，如 MeaNS 主要监测麻疹病毒，RubeNS 主要监测风疹病毒[189]。这些都可以通过互联网搜索进行鉴定，但部分数据访问可能会受限。

五、结论及展望

分子技术加深了人们对感染性疾病，以及过去 40 年新发的和再次出现的为人熟知的病原所致感染性疾病的了解。分子技术不仅用于培养后病原体的分型及鉴定，也可鉴定和检测无法培养或生长缓慢的微生物[254-256]。过去几年在临床实验室中，有一系列非依赖培养的诊断实验出现或使用[251-259]，这也导致在公共卫生实验室用于鉴定病原的培养方法逐渐减少。这种趋势将会代替依赖培养的监控网络如 PulseNet，尤其是在危急状况下。然而，随着二代测序技术的快速发展，包括宏基因组学[260]，这些方法会更大程度地应用于临

床标本中感染性疾病的非培养快速诊断，它可以同时提供鉴定结果、毒力特性及分型结果，从而为公共健康事件(如暴发流行等)的及时检测提供可能，不会像单纯培养因病原体的分离生长时间而延误[261-262]。但在此之前，人们需要面对艰巨的挑战，如建立综合性的序列参考数据库，用于宏基因组学的分析，不仅包括病原微生物，还包括人类微生物组[263-265]。公共健康设施的投资需要保证数据使用者了解如何使用从实验室获得的数据。

参考文献请扫二维码查阅

第12章 微生物保存规程*

ROSEMARY C. SHE, SUSAN M. BUTLER-WU

（朱镭 译；罗燕萍、张利军 审校）

将微生物做长期及短期保存以供日后研究在微生物学领域已有着悠久的历史。早在19世纪80年代，人们观察到细菌可在冰中存活很好，反复冻融则可以破坏细胞壁[1]。直至20世纪初，研究者一直通过优化冷冻干燥等方法来保存组织、病毒和细菌，以便日后研究。对早期研究者来说，目的很明确，保存微生物可供日后研究，也可以在运送到其他实验室时保持微生物的存活状态[2]。事实上，微生物的保存对微生物的多样性和进化研究、患者医护管理、流行病学调查、诊断试验的验证确认，以及教育培训等科学研究是很有价值的资源。保存单个微生物物种，可作为微生物独特表型的永久记录，并为进一步的基因型特征分型提供材料。收集的参考物株有可能包括了引起个人感染的罕见物种，也可能包括了由常见致病原引起的疾病（如社区暴发感染）病原体。

微生物保存有多种方法。有效的存储首先是指能维持生物有机体在存活状态、无污染、没有基因型或表型特征的改变；其次，存储生物体必须很容易恢复到它在保存之前的状态。在过去60年中，针对微生物保存方法，已展开广泛评价，保存的最佳方法往往取决于微生物的种类。已发表的综述文章、专题论文和书籍也提供了存储各种类型微生物的详细信息[3-7]。对于临床微生物学实验室来说，需要操作简单、应用广泛的方法以维持生物体的短期和长期保存。本章介绍的方法可用于细菌、原生动物、真菌和病毒的保存。

一、保存方法的概述

(一)短期保存方法

1. 直接传代培养 维持微生物的短期生存能力最简单的方法就是周期性传代培养至新鲜培养基，这也是经常用于传代培养细菌的方法。虽然简单，但如果微生物保存超过1周，这种方法可能会增加工作量，也需要较大的实验室空间，并可能会影响微生物的表型。每传代一次就增加了不良微生物突变的可能性。此外，传代培养还可能导致质粒丢失。

每种微生物的传代间隔是不同的，此外，突变率差异也很大。一些微生物在重复传代时，可以保持无限期稳定，而一些微生物传代2～3次就可能改变表型性状。然而，直至现在，才利用测序技术开始研究微生物的实际突变率[8-9]。例如，在大肠埃希菌中，每传代1次，每10^{10}个核苷酸中就有约2.2个会发生突变[9]。直接传代使用的培养基、保存条件和传代频率必须明确。

(1)保存培养基：这种培养基需保证微生物的存活且减缓微生物的代谢过程和放慢生长速率。由于微生物具有可以通过突变在不理想的环境下存活的独特能力，因而应避免极端环境。营养成分太高的培养基会引起快速复制，因此，需要更频繁地传代。保存微生物的最佳培养基还没有明确规定，且每个种属的最佳培养基很可能不同，甚至菌株之间也不尽相同。已使用过的培养基包括蒸馏水、胰酶大豆肉汤、营养肉汤，可以单独使用，或与低温保护剂一起使用。

* 注：本章包含 Rosemary C. She 和 Cathy A. Petti 在本手册第11版第11章所呈现的部分内容

(2)保存条件：许多实验室将微生物(大多数是细菌)使用放在操作台上的常规琼脂培养基上短期存储。然而，培养物以这种方法长时间保存容易变干燥。较好的方法则是将微生物传代至带有螺纹管盖的琼脂斜面上，并将它们保存在避光、避免温度变化过大的适当位置。为了防止干燥，盖子需要有橡胶衬垫，或者在拧帽之前或之后，用薄膜包裹在管顶。低温(5～8℃)保存可以减缓代谢过程，可以使微生物较长时间保持活力。

(3)传代频率：由于每个实验室保存条件、使用的培养基和微生物类型的不同，微生物的传代频率尚无固定方案。每个实验室可以进行研究，以确定每个类别的微生物在现有条件下的最佳传代时间间隔。这样的研究涉及在一定时间内传代观察，直至实验室确定每次传代可接受的间隔，以保证微生物的稳定，并且可被有效地复苏(当每次传代时，需选用5～10个代表性菌落，以避免引入改变的基因型或表型特征的可能性)，用于药敏试验质量控制的菌株的传代和保存需遵循已颁布的标准[10]。

(4)质量控制程序：对样本的状态应定期进行评估，但没必要每次传代时进行。应调查存活力、表型稳定性、微生物特性和标本污染率并做好记录。

2. 浸在油下 封闭试管的另一种方法是在样本顶部添加一层矿物油。许多细菌和真菌通过此种方法可以保存长达2～3年，而且此方法无须经常传代。在这样的环境中，微生物仍有代谢活力，仍可以发生突变。矿物油应为药用级别，比重为0.865～0.890。如果矿物油未充分灭菌，则可发生污染。灭菌时，应将矿物油放在烤箱加热至170℃维持1～2 h[4]。不推荐使用高压灭菌方法，因为蒸汽不能像在水溶液那样穿透矿物油。无菌矿物油在市场上也有出售。

制备样本时，需接种5～10个单个菌落至琼脂斜面或管装的肉汤培养基中。一旦发现微生物生长，即加入至少1～2 cm厚的矿物油，使琼脂不暴露于空气中。同简单的传代培养方法一样，应进行生存力试验，确定最佳的传代间隔，以充分保证微生物的复苏。与那些没有添加矿物油保存微生物的方法相比，该法传代培养次数不需要那么频繁，但矿物油很难加入小管中，一旦溢洒，也很难清理。

3. −20℃冷冻 在−20℃的普通冰箱中冷藏或冷冻保存微生物的时间要明显长于那些需经常传代培养的微生物。某些特殊的微生物的活性可以维持1～2年，但总体来说，细胞内冰晶形成带来的损害[6]及电解质波动[4]都可以降低长期存活率。由于保存时间从数月至2年不等，保存所用的培养基尤为重要[6,11-12]。应避免使用现代自动除霜冰箱冻融循环，以防止循环温度的波动破坏微生物。

4. 干燥 虽然大多数微生物在干燥情况下不能存活，但霉菌和一些可形成芽胞的细菌能在干燥条件下长时间地保存。如果经高压灭菌、干燥处理后，土壤可作为保存媒介，然而，它并不是标准、确定和稳定地用于长期保存的物质[4]。将商品化的无色硅胶装入试管，加棉塞，175℃干燥灭菌1.5～2.0 h后，换上无毒橡胶塞，冷却后置于−10℃，4 h后使用，可用于真菌保存，有良好的复苏率[6]。另外，将含有10^8个微生物的菌悬液接种至无菌滤纸条或纸片中，令纸条(片)在空气或真空中干燥，而后将其置于无菌小管中。这些小管在冰箱中可保存达4年时间，有需要的时候，仅仅取出单个滤纸条或纸片即可[4]。这种方法通常用于质量控制菌株的保存。

5. 蒸馏水保存 大多数微生物在蒸馏水中难以生存，但有些微生物可以长时间存活。许多真菌和假单胞菌属，在室温条件下，可在蒸馏水中存活数年[6,13]。McGinnis等发现除了不易形成孢子的真菌外，93%的酵母菌、霉菌和需氧放线菌，可以用这种方式简易、廉价地保存[14]。

6. 棉拭子保存 将纯培养的细菌收集于棉拭子上并放入含或不含碳的凝胶培养基中，可以冷藏保存数天至数周[15]。这是在实验室之间运送分离株的便捷方法。以这种方式收集的细菌也可以冷冻保存长达40天[16]。

(二)长期保存方法

尽管以上所述的方法可保存微生物长达几年的时间，但超低温冷冻和冷冻干燥(冻干)是用于长期保存的推荐方法。虽然超低温冷冻和(或)冷冻干燥的初始投资可能很昂贵，但这些方法随着时间的推移会更省力，需要的实验室空间(例如，一个冻存管与肉汤或琼脂培养基)，并减少突变的

发生概率。当然，突变和可移动遗传元件的丢失仍然会发生。例如，长期保存在－80℃的金黄色葡萄球菌丢失 *mecA* 基因[17]，肺炎链球菌在甘油中冷冻储存后变得对奥普托欣耐药[18]。与其他保存方法相似，冷冻干燥后的存活率随微生物菌种的不同而变化。Miyamoto-Shinohara 等通过评估10年内的微生物，发现冷冻干燥后，短杆菌属和棒状杆菌属的生存率接近 80%，而 10 年后变异链球菌的生存率下降至 20%[13]。

1. 超低温冷冻　微生物可以长时间保存在－70℃或更低的温度中。实现这些温度的系统包括超低温电冰箱和液氮保存单元。不管是停电还是液氮挥发都会出现体系温度的升高。对系统的严密监控和适当的报警机制是必不可少的，因为任何温度的升高都将降低微生物活性。一旦温度升高，需尽快恢复电力并恢复至目标保存温度。甘油或脱脂奶粉等冷冻保护剂的存在则可减少微生物短期暴露于更高温度下的风险[19-20]。如果确实解冻，目前没有指导快速恢复储存条件的指南。下面所讲的重新冷冻密封小管的方法可以考虑使用。

对于长期保存来说，推荐低于－130℃的温度用于对保存条件要求很苛刻的细胞，如真菌菌丝和原生动物。在如此低的温度下，细胞活性和化学反应已停止，但在－70℃，它们仍可能有部分代谢存在。因此，对于某些微生物的长期冷冻保存，推荐保存在液氮（－196℃）或液氮蒸气（－150℃）环境中[3]。

（1）冻存管：冻存管必须能够承受非常低的温度，还要保持内容物的密封。可采用塑料（聚丙烯）或玻璃（硼硅玻璃）管。相比玻璃管必须用火焰密封，而用时需划痕并折断而言，带螺旋盖和硅胶垫圈的塑料管操作更容易。一些供应商出售冻存管［例如，Fisher Scientific Products（Pittsburgh，PA）、VWR Scientific（Radnor，PA）、Wheaton Science Products（Millville，NJ）及 Becton，Dickinsonand Co.（Franklin Lakes，NJ）］。各种冻存管有不同的规格，可从多家供应商购买 Half-dramvials，可以很方便地包装成 12×12 的网格，这样 144 个冻存管可存放在一个盒子里或一层内。

（2）冷冻保护剂：为了避免微生物在冻结、保存和解冻的过程中受到损坏，培养物悬液中经常加入冷冻保护剂。尽管大多数细菌、真菌和病毒在添加剂的保护下可以更好地生存，但研究表明冷冻保护剂会显著伤害某些生物，读者若需细节，可阅读参考文献［3，6］。尽管冷冻干燥法是优先选择，但对于原生动物的长期存活，不添加保护剂的快速冷冻法仍是可接受的。

有 2 种类型的冷冻保护剂：一种是进入微生物细胞，保护细胞内环境的冷冻保护剂，一种是保护微生物外环境的冷冻保护剂。甘油和二甲基亚砜（DMSO）是细胞内环境最常用的冷冻保护剂；蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露醇、山梨糖醇、右旋糖酐、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇和脱脂奶粉主要用于保护细胞外环境。联合冷冻保护剂及表面活性剂（如吐温 80 和 TritonWR-1339）、其他糖类（如蜂蜜）及乳糖酸钙也有使用。最普遍用的冷冻保护剂是 DMSO。然而，随着微生物的不同，其最佳冷冻保护剂也会不同。例如，甘油最适合保存细菌。Hubalek 对微生物冷冻保护剂做了最全面的综述[21]。

甘油典型的添加浓度 10%（vol/vol），DMSO 的添加浓度是 5%（vol/vol）。使用前，甘油需经高压灭菌消毒，之后可在室温下放置数月。DMSO 溶液必须过滤除菌，可以保存在开放的容器内，但使用期限只有 1 个月。细胞外冷冻保护剂中最常用的是脱脂奶粉。脱脂奶粉可以从医疗产品供应商购得，如 Becton Dickinson and Co. 和 Hardy Diagnostics（Santa Maria，CA）。脱脂奶粉需用蒸馏水溶解后高压灭菌，使用最终浓度为 20%（wt/vol），这一浓度是普通牛奶浓度的 2 倍。

（3）冷冻微生物的制备：将微生物接种至可以充分支持最大限度生长的培养基中。在生长末期或静止期（对数生长期或平台期）收集培养物。液体培养基标本离心后得到沉淀物，取出此沉淀物，重悬至 2～5 ml 加有适量冷冻保护剂的肉汤中。对于琼脂标本，可用无菌环刮取琼脂表面微生物，然后，将其直接放入含有冷冻保护剂的冻存管中，并乳化成最终的致密悬浮液。通常每管分装的体积为 0.2～2.0 ml。另一种方法是将含有冷冻保护剂的肉汤倾置于琼脂表面，再用移液管或无菌环刮取微生物制成菌悬液，然后，将肉汤混合物直接转入冻存管中，但这种方法很容易污染。

（4）冻存方法：美国典型培养物保藏中心

(ATCC)建议慢速冻结，控制温度降低速率在1℃/min，直至温度冷却到－30℃以下，随后快速冷却，直到达到最终的保存温度[3]，此程序用一个降温速率可控的冷冻柜可以很好地实现。作为一个替代方案，ATCC建议使用隔热冷冻室，可选市售产品或简单使用一个装有隔热材料的合适的聚苯乙烯盒子。20世纪70年代的研究表明，不控制速率的冷冻，对大多数生物是可以接受的，而且更便宜也更省力[6]。但是仍推荐先将冻存管放置在－60℃冰箱1 h，而后再转入液氮中。当微生物已经一直保存在－70～－60℃中，冻存管可直接放入液氮中。

装有小的玻璃珠或塑料珠的冻存管[例如，Cryobank(Copan Diagnostics，Murrieta，CA)或Microbank(Pro-Lab Diagnostics，Round Rock，TX)系统]也可用于冻存细菌。用菌悬液包裹珠子，吸出多余的菌悬液。使用时，可取出单个珠子，而不需要解冻整个样品。这种珠子针对细菌冻存进行了优化[22]，如果尝试冷冻保存真菌孢子，则需参考制造商信息(Pro-Lab Diagnostics)。

(5)解冻：当从冷冻状态升温解冻时会对微生物造成损害，危险温度为－40～－5℃。研究表明，迅速升温越过这一温度区可以提高复苏率。为达到最佳效果，保存培养物冻存管应放在35℃水浴，快速复温直到所有的冰消失[3,6]。一旦冻存管解冻，应将微生物立即传代到至适当的生长培养基中。在解冻阶段操作需特别小心，因为温度的急剧变化导致管内气压变化而引起冻存管爆裂。在此过程中，必须穿防护服、佩戴护目镜。

然而，在临床实验室中，从实用出发，水浴中彻底解冻保存的细菌或酵母菌是不切实际的或不必要的。对于大多数常规微生物，冻存管在室温下解冻并接种于平板，也有较好的效果。如果保存的微生物冻存管日后还要再用，可以用无菌环或吸头刮取一小部分的冰冻物，然后接种至适宜的培养基。该冻存管不需解冻，可立即继续冷冻保存，日后也可以再使用，对微生物也不会造成很大的损害。

(6)专用保存系统：计算机技术给大批量菌种保存的组织管理和数据库管理提供了便利。一些实验室已经开发了自己的跟踪系统，其他产品则可以通过商业途径获得[例如，Freezerworks (Dataworks Development，Inc.，Mountlake Terrace，WA)和Freezerpro(Ruro Inc.，Frederick，MD)]。这类软件允许用户为存储库中的每个样本输入数据，并且数据以高度组织化，可搜索的方式存储。无线射频识别标签也可用于压缩保存每一个样本的相关信息[例如，ColdTrack vials(BioTillion LLC，Skillman，NJ)或Freezerpro RFID kit]。

2. 冷冻干燥(冻干) 冷冻干燥被认为是长期保存大多数细菌、酵母菌、产孢霉菌和病毒最有效的方式。与其他方法相比，冷冻干燥法能更好地保存微生物，因为冷冻干燥降低了细胞内冰晶的形成从而降低了细胞活性破坏的风险。从标本中去除水分可以有效地避免这一损害。在细菌中，革兰阳性细菌(尤其是可形成芽胞的细菌)用冷冻干燥的方法可获得最大的相对存活率，革兰阴性菌存活率则低些[6,23]，但总体来说，细菌存活力可以维持长达30年。此外，大量的冻干微生物小管占据保存空间小，而且在常温下很容易进行长距离运输。

该过程将冷冻和脱水过程相结合。首先冷冻微生物，然后用真空装置降低大气压力来干燥微生物。冷冻干燥技术已得到广泛论述[5]，所需设备包括一个真空泵通过密封管道连接至冷凝器和标本管。标本管可以单独连接至冷凝器(多道管法)，也可放置于干燥缸内(柜式法或批次法)，即在一较大的空间中进行脱水。Alexander等和Heckly都发表文章详细说明了设备的选用[3,5]。

(1)冻干管：所有冻干标本都是用玻璃管。冻干过程若在干燥缸内操作，则需要用双层玻璃。使用干燥缸法时，加用的外层软玻璃管用来保护和保存脱水的标本。内层玻璃管放入有棉花铺垫的外管中之前，需要在外层玻璃管的管底加入硅胶颗粒。对于多道管法，只需用单层玻璃管。这2种方法中含有实际标本的玻璃管都需用吸收棉轻轻塞住。对多道管方法中的冻干管或干燥缸法中的外层玻璃管必须加以封闭，以保持真空和干燥的大气状态。所有冻干管在使用前需通过在烤箱中加热进行灭菌。

(2)冷冻保护剂：关于冷冻保护剂的研究已有大量综述[5]。总而言之，脱脂奶粉和蔗糖最为常用。脱脂奶粉常用于干燥缸冻干法，蔗糖常用于

多道管冻干法。脱脂奶粉是用蒸馏水将脱脂奶粉稀释至20%(vol/vol)。溶液分装成每份5 ml,于116℃下高压,注意防止过热及焦糖化。这些冷冻保护剂分装成上述小容量后冻存用于日后使用。蔗糖用水配制成24%(vol/vol)的蔗糖水溶液,再加入等体积的含生长培养基的微生物悬液,以确保最终的浓度为12%(vol/vol)。

(3)冻干微生物的制备:与简单冻存一样,想要最大限度地复苏微生物,需要其生长在适当的培养基或培养液中,并处于生长期末或者静止期(对数生长期或平台期)。高浓度的起始微生物数也很重要。ATCC建议最少为10^8 CFU/ml[3],Heckly则建议浓度为10^{10} CFU/ml或更高[5]。

(4)冷冻干燥方法:在干燥缸法中,内含微生物悬浮液的内管单层形式放在不锈钢容器中。将此容器在-60℃低温冰箱中放置1 h,然后转移至低温浴中,如加入干冰的乙基溶纤剂(2-乙氧基乙醇)或其他溶剂,并覆盖有可密封的真空顶盖,该真空顶盖依次连接到也装有干冰-溶剂混合物的冷凝器储罐和真空泵。维持至少30 mmHg的真空压力18 h。同时,外管用烤箱加热过夜,用硅胶颗粒和棉花填充,放置在干燥柜(低于10%相对湿度)中。将冻干管插入到外管中,外管加热密封。多个不同的菌株或物种不能在同一个批次中处理。当2种不同的微生物置于同一容器的相对侧时,交叉污染率为0.8%~3.3%。当微生物混杂在一起时,交叉污染率则高达8.3%~13.3%[24]。

在多道管法中,使用一单个小管架,而不是一个单一的容器。架子放在干冰浴中。冷冻过程之后,将冻干管通过独立的橡皮管和装满干冰-溶剂混合物的冷凝器容器、真空泵依次连接。与上述方法一样,需在30 mmHg的真空压力下维持18 h,然后密封每个冻干管。

(5)保存:每个冻干管都需要适当的标记和分类。在室温下保存不能够保持存活力,因此不推荐此方法。在普通冰箱4℃保存可以接受,但-60~-30℃保存可提高存活率[3,5]。

(6)复苏:因为管内是真空,开管时必须格外注意。全程需佩戴护目镜,同时,冻干管应该覆盖纱布以防打开时外界空气冲入冻干管造成爆炸致人受伤。此外,复苏也应该在一个封闭的生物安全柜内进行,以避免微生物的播散。该冻干管的表面应该用70%的乙醇擦拭,然后,用砂轮划伤冻干管然后折断,或用加热过的针刺穿冻干管的顶部。用注射器或巴斯德吸管加入少量生长培养基(0.1~0.4 ml),振荡内容物直至标本溶解,然后用同一注射器或吸管将溶解物全部注入至适当肉汤或琼脂培养基中。必须对每件样品进行纯度检查,因为在保存过程中可能存在交叉污染或突变的可能性。

3. 新技术 之前所描述的长期保存方法是专为微生物复苏、培养设计的。基于抗原或核酸技术的不依赖培养物的测试已得到广泛使用,这些方法不需要活的微生物。在这方面,保存微生物以保存其抗原或核酸对临床实验室也很重要。沃特曼弗林德斯技术协会(FTA)的矩阵卡(Whatman International Ltd.,Maidstone,United Kingdom)或其他滤纸制品是安全的(灭活微生物)、价格低廉的、快速的微生物DNA长期保存方法[25-26]。细菌和(或)真菌细胞悬浮液直接置于干燥的FTA卡上。FTA卡充满了缓冲液、自由基捕集器和蛋白质变性剂,这些变性剂会在接触时溶解细胞膜,捕获DNA并保护DNA免受降解。全血和血浆标本可以使用干血斑滤纸或基于非纸质基质进行保存,将来可用于HIV[27-29]、乙型肝炎病毒[27]、丙型肝炎病毒[27,29]、伤寒立克次体、恙虫病东方体[30]的抗体或核酸检测。

(三)各类微生物的保存程序

特定微生物的保存方法见下文及表12-1。

1. 细菌 这一章所涉及的材料主要用于细菌的保存。简单传代、保存于矿物油下、干燥或者冷冻于-20℃就能短期保存细菌;冷冻于-70℃的超低温冰箱或-196℃的液氮,或冷冻干燥可用于细菌的长期保存。有关细菌保存研究的综述已有发表[6]。一般来说,连续的传代可以保存细菌最多几个月,保存于矿物质油下或者干燥方法可以保存1~2年,-20℃冷冻可以保存1~3年,-70℃冷冻可以保存1~10年,液氮中保存或者冻干可以保存长达30年[4]。对于一些苛养菌而言,如肺炎链球菌、奈瑟菌属、嗜血杆菌属,最佳的方法有冻干法或用含甘油的胰酶大豆肉汤作为保存培养基-70℃冷冻保存[31-33]。微生物质量控制菌株可在冷冻保护剂中-20℃最多保存1年,或者长期保存于-70℃。

表 12-1 微生物保存的一般程序

生物群	保存方法	冷冻保护剂	保存温度(℃)	保存时间(年)
链球菌	冷冻	脱脂奶粉,甘油	−20	>0.2
	超低温冷冻	脱脂奶粉,甘油,DMSO	−196~−70	>1
	冻干	脱脂奶粉	4	0.5~30.0
分枝杆菌	冷冻	脱脂奶粉,Middlebrook 7H9	−20	3~5
	超低温冷冻	脱脂奶粉,甘油,Middlebrook 7H9	−196~−70	3~5
	冻干	脱脂奶粉	4	16~30
产芽胞菌	传代	无	室温	0.2~1.0
	矿物油浸泡	无	4	1
	干燥	无	室温	1~2
	冷冻	葡萄糖,甘油	−20	1~2
	超低温冷冻	脱脂奶粉,甘油,DMSO	−196~−70	2~30
	冻干	脱脂奶粉,乳糖	4	30
其他革兰阳性菌	传代	无	室温	0.2~0.3
	矿物油浸泡	无	4	0.6~2.0
	冷冻	蔗糖,甘油	−20	1~3
	超低温冷冻	脱脂奶粉,蔗糖,甘油,DMSO	−196~−70	1~30
	冻干	脱脂奶粉,乳糖	4	30
革兰阴性菌	传代	无	室温	0.1~0.3
	矿物油浸泡	无	4	1~2
	冷冻	蔗糖,乳糖,甘油	−20	1~2
	超低温冷冻	蔗糖,乳糖,甘油,DMSO	−196~−70	2~30
	冻干	脱脂奶粉,蔗糖,蔗糖	4	30
丝状真菌	传代	无	4~25	2~10
	矿物油浸泡	无	室温	1~40
	蒸馏水中保存	无	室温	1~10
	干燥	土壤,硅胶	室温	1~4
	超低温冷冻	甘油,DMSO	−196~−70	2~30
	冻干(产孢菌类)	甘油,蔗糖,DMSO,脱脂奶粉	4	2~30
酵母菌	蒸馏水中保存	无	室温	1~2
	干燥	营养培养基	室温	1~2
	超低温冷冻	甘油,DMSO,脱脂奶粉	−196~−70	2~30
	冻干	营养培养基	4	2+
原生动物	冷冻	血,加有 DMSO 或蔗糖的营养肉汤	−40~−20	0~0.6
	超低温冷冻	血,加有 DMSO 或甘油的营养培养基	−196~−70	0.2~7.0+
病毒	传代	营养培养基	4	0.5
	超低温冷冻	SPGA[a]	−196~−70	1~30
	冻干	SPGA	4	6~10

注:[a]SPGA. 含1%牛白蛋白的蔗糖-磷酸-谷氨酸

2. 微生物组 从粪便、阴道样本和痰等临床标本中保存微生物菌群，对于当前的转化研究工作及未来的临床测试都至关重要。通过添加5% DMSO可以保存粪便标本的微生物菌群和其代谢物，可在−80℃下保存长达3个月[34]。如果要保留DNA而不是细胞活性，则无须使用冷冻保护剂进行冷冻保存。当无法迅速进行核酸提取时，粪便在室温下可保持稳定长达24 h，在−80℃下可保存至少6个月[35]。有报道称，用研钵和研杵在液氮中将粪便样品研磨成细粉进行均质化处理，然后分装−80℃下保存，可以提高冻存样品的质量[36]。RNA防腐剂可用于室温下短期保存微生物，但通常不建议用于冷冻标本的保存，因为它们可能会降低DNA产量及不同成分的表观丰度[36]。当冷冻保存于−20℃或−80℃时，阴道和痰样本的细菌组成和代谢谱可以保持数周内稳定[37-39]。对于痰样品，建议在标本采集后12 h内冻存于−80℃以获得最佳结果[40]。反复冻融4次及以上会对粪便和痰样品的微生物组成造成不利影响[36,38]。当先冻存于−20℃然后转存到−80℃时，临床样品可以保持稳定[37,41]。通过将拭子采集的样品直接收集到含20%甘油的液态Amies培养基中，可以将标本收集与长期冷冻保存结合起来，但是目前该商品仅用于研究使用。

3. 原生动物 关于原生动物保存的信息有限，因为临床微生物学实验室通常不需要这种保存。目前对个别种属的不同保存方法已有描述。一般情况下，冷冻比冻干更常用。尽管在−70℃冷冻保存可生存长达数月，但对于下述的许多原生动物更推荐液氮保存[42]。临床实验室很少对蠕虫等其他寄生虫进行冷冻保存，其他一些研究对寄生虫的保存方法也做了描述[42]。以下所有步骤参照ATCC的保存方法，并补充了最新的研究[3]。

棘阿米巴属（*Acanthamoeba* spp.）、利什曼原虫属（*Leishmania* spp.）、纳格里阿米巴属（*Naegleria* spp.）、毛滴虫属（*Trichomonas* spp.）和锥虫属（*Trypanosoma* spp.）等种属可以用5%（vol/vol）的二甲基亚砜作为冷冻保护剂，超低温保存于液氮中。

棘阿米巴属和纳格里阿米巴属可以在室温下于滤纸上干燥。用移液枪移取0.3 ml的原生动物悬浮液至小管中的滤纸上，于室温下干燥14 d，再用真空干燥器干燥1周，最后将小管密封保存于液氮中。

内阿米巴属（*Entamoeba* spp.）常冷冻于−40℃。标本应悬浮保存于含12%（vol/vol）二甲基亚砜和6%（vol/vol）的蔗糖生长培养基中[3]。其他人已经报道了将这些原生动物保存于−70℃的含5%～10% DMSO保护剂或液氮中的成功案例[43-44]。

利什曼原虫属常接种于动物宿主中。在感染的高峰期，取脾并在ATCC811盐溶液终体积的一半内匀浆。用10%的甘油作为冷冻保护剂冷冻保存。对于已在Novy-MacNeal-Nicolle培养基试管中培养的利什曼原虫前鞭毛体（*Leishmania promastigotes*），将试管直接在−80℃冷冻即可成功保存长达4个月[45]。另一些研究表明，如果将其传代培养至倾斜的兔血琼脂后冷冻，原生动物可以存活至少7个月[46]。

疟原虫属（*Plasmodium* spp.）可以用感染的血液标本保存。在寄生虫血症感染的高峰期，取血并且用以下试剂抗凝：枸橼酸钠固体1.33 g、枸橼酸0.47 g、葡萄糖3.00 g、固体肝素（钠）200 mg及蒸馏水100 ml，加入血液中抗凝剂的终浓度为10%。取此抗凝血液，加入含30%甘油的0.0667 mol/L磷酸盐缓冲液，使甘油终浓度为10%（vol/vol），放置液氮中冷冻保存。

锥虫属只能取自于动物宿主体内。在寄生虫血症感染的高峰期，取血并放入含肝素的试管中，用加入1%～5%酚红的台氏液（Tyrode's solution）作1∶1稀释（每升台氏液含NaCl 8.0 g，KCl 0.02 g，$CaCl_2$ 0.2 g，$MgCl_2$ 0.1 g，NaH_2PO_4 0.05 g，$NaHCO_3$ 1.0 g和葡萄糖1.0 g）。之后加入5%的DMSO作为冷冻保护剂保存于液氮中。也可将10%～50%的甘油用作冷冻保护剂。锥虫也可用任何一种冷冻保护剂保存。值得注意的是，锥虫体在冷冻过程中对不同的冷却速率具有相对的抵抗力[43]。

4. 酵母菌与丝状真菌 上面描述的所有技术均可用于酵母菌和真菌的保存[4,6-7,47]。具体使用哪种方法取决于要保存的种属和是否生成孢子。

（1）传代培养：传代培养是保存真菌最简单的方法，包括不断传代至新的固体或液体培养基中，通常保存在室温或冰箱中保存。真菌可通过传代培养保存若干年，但必须注意防止气溶胶和来自实验室及其他样本的污染，所有工作必须在生物

安全柜中进行。

(2)保存于油下:曲霉菌和青霉菌可以在油中保存 40 年[7],但许多标本在 1～2 年后会出现衰退,所以一定要定期转种。

(3)水中保存:许多真菌可以在蒸馏水中成功保存很长一段时间[13,48]。最简单的方法是用移液枪转移 6～7 ml 无菌蒸馏水,加至螺旋帽试管斜面上的 2 周培养物中。用移液枪的吸管刮取孢子和菌丝碎片,并将悬浮液转移至无菌 1 g 小管中,旋紧管帽,保存于 25℃。通过将 0.2～0.3 ml 的悬浮液在适当的培养基中传代以复苏[49]。

另一种改良方法是将琼脂块从真菌菌落生长的边缘切出,并将其放置于无菌蒸馏水的试管中,旋紧试管帽[50]。该培养物保存于 20～25℃条件下。将这块琼脂糖凝胶移至生长培养基中,并且让菌丝侧朝下接触培养基,可以通过种方法复苏真菌[7],但是这种方法的突出问题是污染率高达 22.8%[50]。

(4)干燥:前面描述过的干燥方法可以用于真菌保存。以这种方式存储的 16 种真菌中只有 6 种可以存活 4 年[51]。已报道认为最成功的方法是将产孢真菌保存在硅胶或者土壤中[7]。

(5)冷冻:通过使用甘油或 DMSO 作为冷冻保护剂,置于液氮中可成功保存真菌。酵母菌也可以超低温度储存于脱脂奶粉中。含有非致病性真菌的肉汤培养物用 Waring 搅拌器制成匀浆等量地悬于二甲基亚砜或甘油中,至最终浓度分别为 5%或 10%。致病性的真菌不能用机械研磨器粉碎,因为会引起气溶胶相关的生物危害。组织胞浆菌属、副球孢子属和芽生菌属应该于酵母期冷冻,而球孢子菌属应该在菌丝体的早期冷冻,以最大限度地减少实验室人员的暴露。冷冻程序的其他方面则与前所述相同。

(6)冻干:大部分已经形成孢子的真菌都可以用冻干法保存。要冻干保存的培养物在琼脂糖或肉汤培养基中生长至孢子量生长的高峰期[3],后面的程序则如前所述。已证实这种方法可以将真菌保存若千年[52-53],但此方法只适用于孢子形成真菌。真菌的幼体营养菌丝不能在冻干后保存[7]。

5. 病毒 超低温冻存在很多情况下都适用于病毒保存。如上述一样,甘油和 DMSO 可用作冷冻保护剂。对于临床实验室中分离出的大多数病毒,感染细胞培养的病毒上清液可以直接冷冻,特别是如果培养基中含有动物血清,可以作为冷冻保护剂。除了上述描述的冷冻保护剂,含 1%的牛血清白蛋白的蔗糖-磷酸-谷氨酸和高渗蔗糖溶液非常有效,后者常用于保存不稳定病毒,如呼吸道合胞病毒[6,54-55]。如果采用超低温冷冻,使用小体积的病毒悬液(0.1～0.5 ml)冷冻的速度应尽可能快。除了冷冻纯毒株外,已知含肠道病毒的粪便标本可以在－85～－70℃中保存 6～10 年仍有较高复活率,并且星状病毒、小圆结构病毒(即诺如病毒)、肠道腺病毒、轮状病毒和杯状病毒在形态特征上无变化[56]。

Gallo 等评价了 5 种培养基保存感染 HIV 的外周血淋巴细胞,结论为外周血淋巴细胞可冷冻于－60℃,可在含有 10%小牛血清和 10%二甲基亚砜的 RPMI1640 液中保存 HIV[57]。

冻干可能是长期保存病毒的最佳方法。已有一些关于保存细节的综述发表[58]。在含有 1%牛白蛋白的蔗糖磷酸-谷氨酸盐的培养基中冷冻干燥的病毒悬浮液可以更好地存活[6,59]。若通过透析或超滤将溶液中的电解质去除,脊髓灰质炎病毒及其他肠道病毒的冻干效果最好[6]。

6. 特殊病原 针对 2002 年的《公共健康安全与生物恐怖主义预防应对法》,联邦法规要求储有特殊病原的实验室应注册并符合该法案制定的标准[60]。目前,属于特殊病原微生物的完整目录可以登录 http://www.selectagents.gov 网站查询。无论使用何种长期保存方法,如果实验室想使用、持有或转移特殊病原或毒素,必须按照联邦特殊病原程序注册。为了最大限度地减少公共健康和安全风险,特殊病原体必须保存在限制出入和有适当安保条件的高度安全区域。只有完成培训、持有注册证的个人,才可以接触和复苏保存的这些微生物。长期保存的特殊病原必须有准确、详细的清单。有关保存特殊病原的详尽指南可从美国疾病控制和预防中心网站(https://www.selectagents.gov/ig-criteria.html)获得。

二、灾害防备

实验室应考虑其所收集微生物的价值,并有书面的生物安全应急计划[20],尤其是鉴于最近的

自然灾害，如飓风等。对于重要或大量长期保存的微生物，国际环境和生物保存协会提供应急准备指南（http://www.isber.org）。

将保存微生物相关的书面或电子数据备份副本是较好的做法。如果可行，实验室可以考虑将不可再采集的微生物分成 2 份，放在不同的容器内或不同的实验室里。液氮保存容器不需要恒定的电源即可运行。可在预期疏散前填满液氮，此举可最大限度地提高其温度稳定性。对于电冰箱，实验室应考虑连接到备份电源，如不间断电源或发电机。

三、未来方向

微生物学领域正在迅速发展，特别是在基因组学和蛋白质组学的时代。关于人类遗传学、医疗保健流行病学、全球健康、抗微生物药物耐药性、微生物分类学和感染病学的研究在很大程度上依赖于精心保存的微生物库。临床实验室拥有丰富资源用于微生物保存及长期保存，任何个人也都可以为国家或国际微生物的收集库做出贡献。此外，通过收集和保存生物标本，如人类血和尿，尤其是来自培养不出病原体或临床症候群不确定的患者，这些都有助于病原体的发现、基因组学和蛋白质组学研究的进一步发展。保存这些生物样品完整性的科学程序已经取得了较好的发展，长期保存时间可以达到 30 年[61-62]。大家应该积极与为标本和微生物资料库做出贡献的科学界合作机构（如优质的区域研究中心或政府资助的项目）合作。未来许多需要解决的问题都依赖于今天的临床实验室。

参考文献请扫二维码查阅

第13章　实验室获得性感染的预防

PHILIPPE LAGACÉ-WIENS, MICHAEL PENTELLA

（赵宗珉　译；罗燕萍、徐和平、宁永忠　审校）

一、概述

（一）流行病学

自19世纪80年代，Robert Koch在简陋的条件下发现结核分枝杆菌后，许多事情发生了改变。当今先进的实验室设计、实验设备和操作为实验者提供了更安全的工作环境。这种重要的改进开始于20世纪40年代，针对具有高度传染性的病原体开展的生物学防御程序。1961年，因为对实验室获得性感染（laboratory-acquired infections）担忧的增加，G. Briggs Phillips撰写了："技术研究35：美国和国外实验室的生物安全"[1]。通过对18个国家的102个实验室的研究，记录下使用各种方法控制实验室获得性感染所发生的巨大的变化和有限的成功。得出结论：①预防实验室获得性感染需要广泛、系统的方法，不应局限于简单的技术控制。②实验室管理层有责任指导并支持实验室安全计划。③进一步评价了实验室设计对安全的影响。

然而几十年来，尽管生物安全实践和设备在不断改进，实验室内暴露于感染性病原体和实验室获得性感染仍是很大的困扰。通过针刺和尖锐物体的伤害、雾化吸入、经口摄入、眼部飞溅、黏膜飞溅、接触受污染的表面，和其他未知的途径可发生感染暴露[2]。此外，在相邻工作区的工作人员有时也会受到感染。1986年，研究人员回顾分析公共卫生实验室和明尼苏达州医院实验室损伤类型，他们发现医院实验室损伤中63%为针刺伤，21%为切割伤、擦伤、吸入、摄入，皮肤损伤只占1%[3]。Sewell密切关注美国和英国实验室获得性感染报告[2]，名列榜首的是伤寒，随后是Q热、布鲁菌病和肺结核。据估计，8%～30%的实验室工作人员接受过结核菌素试验（TST）检测[4]。实验室从事脑膜炎奈瑟菌培养的工作人员感染风险显著增加。据估计，美国临床实验室每年可检测分离出3000例侵袭性脑膜炎奈瑟菌分离株[5]。

因为没有强制性司法报告制度，实验室暴露和实验室获得性感染的真实发生率仍然未知，实验室获得性感染的发生率可能明显高于文献中报告的案例。

（二）实验室生物安全和生物安保

简单地说生物安全（biosafety）是保护实验人员，避免在实验室处理病原体时患病。而生物安保（biosecurity）是防止病原体被那些想利用它们达到伤害目的的人获取。最近发生了一些使用病原体引发骚乱的情况，最广为人知的事件是利用美国邮政系统向选定的媒体和政府人员发送包含炭疽芽胞杆菌的信件[6]。

（三）病原体危险分类

为了对病原体进行分类，美国和许多国家将病原体归纳为风险组（risk groups）。风险组仅适用于实验室工作。大多数国家都参照世界动物健康组织的分类方法，根据病原体对动物与人类健康的风险将动物病原体分为四组。风险组决定着在处理微生物时所需采取的防范级别。世界卫生组织（WHO）根据可能导致动物或人类潜在疾病严重程度、疾病传播能力、治疗的有效性将微生物分为4个风险组。WHO风险组1包含非致病微生物；风险组2包含致病微生物，可引起疾病且地区意义有限，对于风险组2的病原体，不存在传染性或传染性弱，并且感染后可成

功治愈；风险组3包含可引起严重疾病或流行病的微生物，然而，通常这种微生物具有有效的接种和治疗方案；风险组4常引起极其严重的大流行，死亡率高，且通常不具备有效的预防或治疗措施。在美国，生物风险组分类可以见文件《生物安全和微生物学及生物医学实验室(*Biosafety and Microbiological and Biomedical Laboratories*)[7]。在加拿大，公共卫生局在其实验室生物安全指南中提示相关信息(可在线查阅 http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/lbg-ldmbl-04/ch2-eng.php 及印刷版本)[8]。

实验室生物安全等级(biosafety level，BSL)决定于其设计特点、构造和防护设施[7]。生物安全等级1(BSL1)实验室是设计用于处理不易引起人和动物疾病的微生物的基础实验室；BSL2实验室是设计用于可以引发疾病，但感染后传染性弱，且具有有效的预防或治疗措施的病原微生物的基础实验室；BSL3实验室是设计用于可以引起严重疾病，但致病微生物通常不会通过人与人进行传播，而且具有有效的治疗和预防措施的病原体的实验室，需具有防范设施；BSL4是设计用于可以引起严重疾病，感染后传染性强且无有效的治疗和预防措施的病原体的实验室，具有最强的防范设施。大多数临床实验室为BSL2，有良好的实验室操作场地和有效的生物危害标志。在BSL2实验室里，工作是在开放的工作台上进行的，有时在生物安全柜中进行——可用于具有潜在的气溶胶产生过程的实验。部分临床实验室也设有BSL3实验室。在BSL3实验室中，具有与BSL2相同的实验室操作规程，外加特殊的衣服、受控的通道及特殊的工程和设计功能，例如，密封的天花板、墙壁和地板，具有高压灭菌器和双层锁门；门和通风口周围的空间应能够密封，有助于空气净化[7]。在BSL3中，所有工作都在生物安全柜中进行。

(四)生物安全计划的组成

临床微生物学实验人员比其他实验室人员暴露于感染性病原体的风险高，因为病原体存在于哪个样本是未知的。临床医生很少将自己所怀疑的病原体通知实验室。有时临床微生物学实验需要扩增病原体，处理感染性病原体时常存在危险；然而，平衡风险进行检测以满足患者需求是义不容辞的责任。生物风险管理计划的基本组成部分是执行风险评估，选择降低风险的机制，评估人员能力，培训，积极的生物安全委员会，执行安全审核，与职业卫生计划的合作，并不断改进生物安全措施。

二、风险评估和降低风险

每个实验室必须进行风险评估，这对该实验室的工作有特别意义，并且确定每项工作构成的相对风险级别。由经验丰富的实验室人员和实验室的生物安全官员进行风险评估。进行风险评估时，实际经验和解决问题技能是必不可少的。评估人员需要具备安全原理、传染方式、危害(hazard)、监管要求和设施等相关知识。评估结束后，工作人员和管理部门需要回顾分析风险评估文件。

风险评估的预期结果有双层意义，首先，它提供了特定风险的信息，其次，它将风险降低到可接受的水平。风险(risk)的定义为，暴露发生后，对健康产生不利影响的事件引发一定程度危害的概率。风险评估需要收集所有可用的危害相关信息，进行评估以确定暴露的风险。生物安全风险评估是系统地评估在处理样本和传染性病原体时的过程或程序中可能潜在的风险。风险评估是防止实验室获得性感染的重要工具。风险评估要求仔细对工作环境进行检测，发现在工作过程中可能对实验室人员造成伤害的潜在危险。这种微生物风险从实验室接收标本时就开始存在。在处理样本容器外部时，如果外部受到污染可能会带来风险。处理标本时通常需要手动处理样本材料、接种培养基和准备用于染色的载玻片。每个标本构成的风险不同，因此，应针对每个样本类型进行独立分析。临床微生物学实验室接收的标本类型从血液、体液、粪便到拭子。培养孵育后，在检查培养皿生长情况时依然存在风险。在读取培养皿过程中，当培养皿打开时，培养皿中的培养基存在气溶胶产生风险[9]。在鉴定和敏感试验的流程和操作中，进一步增加了暴露于微生物病原体的风险。

风险评估的执行具有重要价值，因为它可以确保符合监管机构的要求。风险评估的结果可以作为空间和设备调整的依据。重要的是，风险评

估是评估应急预案的机会，也为评估潜在程序更改提供机会。

风险评估不是一次性事件。通常，风险评估应在新的实验室开始工作之前进行，包括无论何时进行了搬迁或翻新，人员流动很高时（以致降低了对生物安全操作的记忆），或者每当将具有新生的安全风险感染物质、试剂或设备引入实验室时。当制造商和提供耗材的厂家更换时，风险评估应重新进行（例如，个人防护设备 PPE、容器、废物处理材料、培养基、工具包）。如果近期发生事故，实验室获得性感染、盗窃和安全违规，风险评估也应该重复。表 13-1 列举了何时进行风险评估的示例。

表 13-1 何时进行风险评估的示例

何时进行风险评估
工作开始前
进行了搬迁或翻新
发生人员流动
引入新的有生物安全风险的感染性物质
购买新设备、耗材和（或）试剂
暴露后事件调查期间
法规发生变化时

要开始风险评估的过程，创建包括过程步骤、潜在危害、初始风险级别、减轻措施（mitigation）和剩余风险级别（图 13-1）的模型非常有用。首先，应记录在实验室中发生的活动。各个实验室的活动多种多样，因此，每个实验室都应进行自己的风险评估。这包括对实验室工作流程的审查，以及与实验室人员活动的讨论。从风险的角度对工作流程进行审查，可以识别实验室中的危险。在生物安全风险评估中，危险来自病原微生物，即细菌、病毒、真菌和原虫。评估者必须审查这些微生物的宿主范围，特别关注人类病原体。识别危险需要列出在实验室通常遇到的病原体和实验室可以合理预计遇到的其他微生物。所有微生物，不论是经常还是很少遇到，都应予以考虑。评估者应预期到意外情况，并注意新出现的微生物和该国该地区经常遇到的情况。公共卫生部门的法定疾病清单可以为准备病原体清单提供有用的信息。当然，为所有可能的病原体做过度准备，既不明智又浪费资源。风险评估应只是关注实验室可以合理预期会遇到的病原体。如果新微生物出现，风险评估应重复进行。

微生物*（如果涉及很多，请选择最危险的）	任务（任务频率**）	暴露途径***和相关风险****	特定安全规范	生物安全等级推荐	所需工程控制	所需个人防护设备	废弃处置注意事项	与个人防护装备、控制和维护相关的剩余风险和安全规范

图 13-1 风险评估模型

注：* WHO 分类，①低（与疾病无关）；②中度（与极少的严重的疾病有关）；③高（与严重或致命的疾病有关）；高（与严重或致命的疾病有关，很容易在人与人之间传播，通常无有效的干预措施）；** “每日”定义为每周 4 天或更多天；“定期”定义为每周 1～3 天；“偶发”定义为每月＜4 天；*** 吸入、摄入、经皮或黏膜；**** “低”是指该微生物不太可能通过此途径感染；“中”是指该微生物可以通过此途径感染；“高”表示该微生物很可能通过此途径感染

在列出实验室可能遇到的微生物名单之后，重要的是评估哪一种病原菌引起实验室获得性感染。每种病原体都应根据致病性（pathogenicity）、毒性（virulence）、传染性（transmissibility）和感染剂量（infectious dose）评估其风险。出于风险评估过程的目的，应将致病性定义为感染因子引起疾病的能力，而毒性是指某因子引起疾病的能力及其导致疾病的严重程度。传染性是指病原体通过与患者和（或）其体液接触而在人或物种之间传播的容易性，以及感染者多长时间内有感染性。感染剂量是指引起宿主感染所需的病原体的量。还应考虑病原体的生存时间和在污染表面上生存的可能性。此外，还应考虑疫苗和其他治疗方案的疗效。

通过各种暴露途径人类容易接触感染因子。对几乎所有的因子，完整的皮肤都是极好的防护屏障，但是黏膜、眼、鼻和口、破损的皮肤为病原体入侵提供入口。在临床微生物学实验室，锐器伤害可能和气溶胶一样危险。防止飞溅将保护个体，避免通过黏膜、胃肠道和皮肤遭受病原体感染。这些微生物也可由皮肤传递至眼、鼻和口。需要特别关注通过气溶胶途径造成的感染，根据处理病原体的性质，把戴口罩或呼吸器作为特定的防护。

根据风险评估期间收集的信息，病原体归类为低度、中度或高度风险，并制定降低风险的计划。临床实验室中，可使用 3 种风险降低方案。第 1 种也是最有效的是工程控制，包括使用生物安全柜，它提供了一个封闭、通风的安全实验空间，可以用来处理有害物质。其他工程控制包括单向通风控制、锐器盒、离心机安全罩、防溅罩和移液助手[10]。此外，一些临床实验室拥有 BSL3 实验室空间，其中的空气可直接通过高效过滤(HEPA)过滤器排出到室外。第 2 种选择是使用行政管理条例和工作操作规范控制，要严格遵守政策标准，微生物学操作规范需要强制执行到位[7]。洗手、标牌、禁止在实验室内进食和饮水，以及对接触面的去污染对降低风险至关重要。第 3 种降低风险方案就是个人防护设备，包括防护服、手套、面罩、护目镜和呼吸器。为成功防护，工作人员必须接受关于正确使用个人防护设备的培训。正确的穿脱防护服至关重要，既要防止自身污染，又要防止污染工作中的其他人员、环境，甚至是社区中的其他人。在生物安全柜工作时穿戴个人防护设备就是使用个人防护设备做多余保护的实例。(译者注：如对 SARS 病原体和新型冠状病毒而言，这并非多余保护)个人防护设备只保护穿戴它的人，威胁仍然存在于环境中。降低工作风险的 3 种方案协同工作，创造安全的工作环境。

使用所有可用的工程控制、管理控制和个人防护设备都不会将风险归零，完全消除临床微生物学实验室发生风险是不可能的，接触病原体的工作性质决定了风险始终存在。然而，这种风险可以而且应该减少到可接受的水平，总要考虑有人为错误或其他因素的可能性。在为每个流程步骤确定适当的减低风险措施后，判定评估剩余风险及其可接受性。理想情况下，可接受的感染风险应尽可能低。

(一)能力评估

“能力是一个可衡量、可记录的因素，不仅与学习和持续增长的技能相关，而且与判断能力、对受限的工作环境的认知能力、个人技能、实验室中其他人的技能相关。”[11]工作人员在实验室中安全工作所需的能力应该是基于风险评估。一般而言，能力包括实验室生物危险知识、实验室生物材料使用时的防控知识、生物材料工作操作规范，以及应急措施。为了安全地履行职责，微生物学工作人员必须具备管理控制(engineering controls)能力，例如，使用生物安全柜，成功使用个人防护设备。

一旦完成风险评估，确定了降低风险的步骤，工作人员需达到何种能力水平也已确定。通过建立教育及培训架构提高工作人员的能力，确定员工角色和工作责任关系，并评估个人绩效和组织能力。每年 1 次的能力审查是提醒工作人员生物安全、遵守安全预防措施的重要机会[12]。

(二)培训

工作人员的能力是通过培训发展起来。基于风险评估培训所需的能力，须将培训需求纳入实验室的安全指导计划中，并进行持续的培训，以确保员工合规并有最佳表现。优化生物安全具体培训的例子是穿脱个人防护设备：由于实验室活动的多样性和使用的个人防护设备不同，各实验室穿脱个人防护设备顺序和步骤不同，因此，每个实验室应根据自己的实际来培训工作人员适当的穿脱程序。各机构可以选择自己培训或选择第三方进行培训。每个机构应确定最佳培训模式，培训应包括书面材料和考试，以确保员工已经掌握了所需的知识。

(三)核查

为保证生物安全计划有效，必须进行监控。须定期进行内部和外部核查。由领导和同事通过日常监控观察工作人员生物安全操作是最佳做法。为了维持有效的生物安全，重要的是员工不要偏离安全操作规范。当生物安全操作不符合规定时，提醒员工是管理层的责任，并确定是否需要进一步培训或采取其他行动。定期监控有助于在

机构内建立安全文化。同样，由有相关知识的同事，如生物安全委员会成员执行核查，可以确保严格遵守生物安全操作规范，维护生物安全装备以降低风险。

(四)生物安全委员会

生物安全委员会帮助监督安全计划、执行安全审核，进一步推动确保安全。安全委员会的成员应是经验丰富的技术人员，具有良好的批判性思维能力。委员会成员最好定期轮换，以便保持较高的工作热情。委员会应该有一份书面文件，说明其权限级别和对安全实践的投入。

(五)职业健康计划

有效的生物安全计划需要职业卫生部门的支持。某些宿主个人因素可以导致实验室人员自身感染风险增加，例如，治疗或药物可能产生的免疫抑制作用。慢性疾病，如哮喘、肺气肿或严重呼吸道系统疾病会增加感染的风险。怀孕是一种免疫抑制状态。某些药物可以降低工作人员的手指灵活度或反应时间。岗前医学评估是识别在现有医疗条件下可能会干扰特定岗位职责的绝好机会。一旦人员处于某职位，需定期进行医疗评估。例如，每年需进行防毒面具的净化和装备检测。定期体检也可用于调查避免亚临床疾病如潜伏性肺结核的发生，并提供员工有效疫苗的机会。正如免疫抑制剂会使工作人员面临发生实验室获得性感染更高的风险一样，其他宿主因素如压力、疲劳、精神状态变化和工作量过大也会增加感染风险。这些因素是重要的变量，可能导致工作人员工作效果下降，体检时应同时关注这些因素。

三、生物安全管理计划

将生物安全计划与临床微生物学实验室中其他质量举措一样对待，会更加有效。应将生物安全计划视为与临床实验室中其他质量管理活动一样重要，这样可以确保计划的持续改进，并可以将该工作纳入到实验室正常运转过程中。与其他任何质量改进活动一样，测量和评估有助于生物安全计划改进。通过 CEN 工作协议(CEN Workshop Agreement)发展的欧洲标准化委员会(European Committee for Standardization)(http://www.cen.eu)系统是首个国际性的解决生物风险、提高生物安全和生物安保的机构。值得注意的是，CEN 工作协议认识到，实验室领导承诺建立一个有效的生物风险管理系统的重要性。这项承诺确保在生物安全和生物安保政策中提供足够的资源、优先的权利和有效沟通。通过建立生物风险管理体系，实验室可以改善管理流程，防止整个实验室的生物风险暴露和扩散。通过生物风险管理质量保证活动，组织中所有员工会认识到其在质量保证过程中的作用。通过定期核查和回顾，持续改进风险评估。通过教育和培训，进一步增强实验室人员素质，使生物风险管理获得保证和改进。

实验室相关政策需保护工作人员、合约商、参观者、社区和周围的环境免受实验室内处理和储存生物制剂的影响。政策、目标、核查、数据分析、风险评估的总结、纠正和预防与管理保证质量持续增高，生物安全风险管理计划必须让机构中的每个人参与，包括实验室负责人(laboratory director)、管理人员(management)、生物安全官员(biosafety officer)、主管(supervisors)、技术专家(technologists)、技术人员(technicians)及行政支持人员(administrative support staff)。

生物安全手册

每个实验室都需要安全手册，包含安全操作指导并作为培训的依据。生物安全手册还作为安全计划的书面文件。它有效提供安全程序，以便所有员工遵守相同的操作规范。每个人都可以使用生物安全手册是一个最佳做法。通过年度修订和当政策或操作发生变化时保持手册更新是必不可少的。它涵盖实验室、设备、现场人员及病原体所需要的协议和操作规范。维护生物安全手册的责任应交给生物安全官员和其他高级管理人员。在生物安全手册中，生物安全计划要遵守国际和国家法规和准则。实验室中具体的生物安全标准操作程序，例如，如何使用个人防护设备，在生物安全手册中有详细描述。它还包含用于生物安全计划的设施表格和其他模板。生物安全手册详细描述应急事件预案、职业健康和医疗监测计划，以及呼吸保护程序。表 13-2 提供了生物安全手册章节的示例，表 13-3 展示了生物安全手册标准操作规程的示例。

表 13-2 生物安全手册章节的示例

1. 简介和机构概述
2. 作用和责任
3. 相关准则和规定
4. 适用的感染源摘要和风险评估
5. 实验室设施描述和建筑布局
6. 实验室安全设备的运行与维护
7. 实验室安全工作规范
8. 个人防护设备
9. 人员健康计划
10. 事故和应急预案
11. 生物材料清单
12. 实验室安全审核
13. 安全培训

表 13-3 生物安全手册标准操作规程示例

1. 实验室遵循的一般工作规范
2. 授权人员的实验室进入流程
3. 样品运送
4. 包装和运输
5. 免疫实践
6. 样品库存控制
7. 泄漏清理和响应
8. 废物处理与处置
a. 废物分类
b. 标签废物
c. 废物的收集和运送
d. 最终处理

四、预防实验室获得性感染的关键安全举措

所有实验室都必须有安全举措以减少实验室事故和感染的风险。过去几十年，实验室感染和事故的急剧下降，很大程度上归因于建立了这样的安全标准[13]。还有一些优秀的综合性出版物提供关于实验室安全主题的话题[2,8,10]。此处将一些关键要素做一综述。

(一)准备

实验室准备是识别和应对任何时候发生职业、个人和公共卫生威胁和危害(生物学和其他)的能力。对于临床微生物学实验室，这包括识别对个人和公众健康产生重大危害的病原体，包括新出现的病原体和生物恐怖，以及对其他潜在危险的准备，如化学和生物泄漏、火灾和伤害[10]。总体而言，它需要专家和训练有素的工作人员在应对危险时有相应的文件和信息、培训和演习、能力和熟练程度评估，以及应对伤害的适当设备。每个实验室都应有 1 名有资格的生物安全官员监督实验室生物安全和准备[8,10]。此外，工作人员应定期接受能力检查，确保他们了解设备的功能(如防溢漏工具包和眼部洗涤装置)，知道如何报告问题及在哪里获得信息，掌握必需的穿脱个人防护设备的技能，识别病原体、毒素、危害等在临床和微生物学方面的关键特征。培训和演习(如使用洗眼装置、淋浴、防溢漏工具包和急救包)需要定期进行并记录。最后，还需有清晰和有据可查的实验室事件报告系统[8,10]。在发生事故，溢漏，火灾和其他地区危险情况下，可能仅需通知实验室管理层和地方卫生当局。如果出现高致病性微生物或对公共卫生发生重要影响的微生物时，通常需要通知区域公共卫生管理部门，联系感染控制和感染性疾病专家[8,10]。表 13-4 列出了临床生物学实验室需做的准备。

表 13-4 实验室需做的准备

种类	项目
文件	材料安全数据表、病原体安全数据表、火灾计划泄漏计划、工作场所危险物质信息系统文件、生物危害/生物恐怖主义防范计划、培训文件、生物安全手册
专业人员	受过危险货物运输培训的人员、经认证的具有识别高危重要病原体的能力的人员、生物安全官员、感染病专家、微生物学家
培训	危险货物运输培训、识别具有公共卫生重要性的关键病原体初步培训和能力评估个人防护设备的使用
设备	防溢工具包(根据需要可加酸、碱、有机物、微生物)、洗眼器、淋浴水槽、急救箱、生物安全柜、消毒剂、个人防护设备
实践演练	定期进行消防演习和灭火器演习、防溢演习(化学和微生物学)、能力测试(评估关键病原体的识别能力)

(二)洗手

洗手是医疗机构中防止一些病原体感染非常有效的方法[14]。研究显示，洗手可减少病毒感染的发生、腹泻和抗生素耐药病原体所致感染的传播[10,14-15]。同样，乙醇擦手也可以减少一部分病

原体在健康护理时发生感染。虽然没有确凿证据显示洗手减少实验室获得性感染，但毫无疑问，在普通健康卫生环境及各种社区环境中，洗手都是有益的。因此，迫切需要所有实验室都备有足够水槽和肥皂用来洗手。理想情况下，在所有实验室的出口和入口都有洗手处，而较大实验室应该增设洗手处。有效的洗手程序应该列入实验室安全培训计划。手揉搓剂(hand rubs)应视为辅助手段，而不能替代肥皂和水洗手。有资料显示，在一些关键病原体如艰难拟梭菌(以前被称为梭菌)和无包膜病毒去污染时，手揉搓剂效果不佳。

(三)手套

在临床微生物学中，常规使用手套仍然具有争议[16]。完成某些工作时戴手套是强制性的(例如，处理患者标本、血培养和有潜在高致病性的病原菌、进行分子诊断检测、使用生物安全柜、手部有开放损伤和炎症时)，但在日常开放式工作时可以根据情况选择是否戴手套[10]。手套在微生物学台式工作中很容易污染，并且已证明使用它们可以减少医护人员洗手的频率[17]。戴污染的手套与已经发生手污染一样，给自己和他人带来较高的风险。尽管常规佩戴手套，但在实验室内一样会发生实验室获得性感染[16]。工作人员在开放微生物学工作台工作中需要常规戴手套的决定应该进行多方面的风险评估，权衡手套对手灵巧性的影响，戴污染手套之后造成自身及表面污染的风险，以及减少遵循洗手流程依从性的可能，而洗手有减少感染和定植风险的益处。如果使用手套，必须经常更换，在实验人员离开、变换工作区域及手套发生污染时，需脱掉并丢弃手套[10]。

(四)面罩和呼吸器

生物安全柜外，如果有气溶胶存在，应该使用外科口罩和护眼装置(护目镜或面罩)[10](译者注：有气溶胶时，外科口罩不太合适)。而在常规的微生物学工作中，个人防护设备的形式是可以选择的。如果基于风险评估的微生物学工作需要进行呼吸保护，必须使用N95口罩和合适的呼吸器，外科口罩无效[10]。用于防护空气传播的生物危害的呼吸器等级必须为N95或以上，化学防护的呼吸器不足以防治生物危害[10]。N95口罩和呼吸器在用于呼吸保护前必须经过配合测试，配合测试应定期(每年)做记录[10]。

(五)实验室隔离服、防护服、工作服和鞋类

在实验室应穿着保护性实验室隔离服、防护服或制服(如工作服)以防止污染个人衣物[10]。这些防护服应防水，在正常使用过程中以防止潜在的感染性液体接触个人衣物、皮肤和内衣[10]。在实验室工作期间应始终穿戴，及时丢弃(一次性的)或清洗。在工作人员离开工作区域前，需脱掉或丢弃这些保护性着装[10]。鞋应包裹工作人员整个脚，安全舒适，最大限度降低跌倒绊倒风险(如平跟鞋)。根据风险评估，某些时候可能需要穿着防水靴罩。

(六)消毒剂的选择

实验室表面和仪器消毒剂的选择取决于实验室的需要、工作类型(例如，分子诊断或分枝杆菌培养)，以及消毒剂将要接触表面的类型。在常规用途时，一些消毒剂标明了既具有杀灭血源性病毒的抗病毒作用，又对大多数常见病原体具有抗细菌作用[10]。一些还具有抗分枝杆菌和杀芽胞作用。在有特殊需要时，亦有多种消毒剂可供选择(例如，美国环境保护局在 https://www.epa.gov/pesticide-registration/selected-epa-registered-disinfectants 网站提供经批准的消毒剂清单)。如果表面耐受，家庭可以选择1∶10漂白剂(5.25%次氯酸钠)最终浓度为含氯量5000 ppm(0.5%)用作常规消毒剂[10]。无论选用何种表面消毒剂，消毒时表面接触时间必须足够。乙醇消毒剂不应单独用于消毒表面，因为它们易挥发，接触时间不够[10]。例如，家庭使用1∶10稀释漂白剂消毒后，可再使用70%的乙醇处理漂白剂残留，避免破坏表面材料。

(七)免疫和筛查

实验室应与公共卫生和职业卫生部门合作，应对相关病原体进行全面免疫，对相关病原体的免疫力基线进行筛查[8,10]。这些方法将根据实验室的工作类型而有所不同，但应至少包括对麻疹、腮腺炎、风疹、水痘和乙型肝炎的免疫力的筛查，必要时提供免疫接种，并提供所有常规建议成人进行的疫苗接种和流感疫苗接种(按季节)[10]。是否选择为脑膜炎奈瑟菌A/C/Y/W135和多组分血清B型脑膜炎奈瑟菌提供疫苗接种应结合风险

评估进行。微生物学实验室工作人员获得职业性侵袭性脑膜炎风险较高，而与使用的疫苗相关的风险很小[5,13,18-22]。进行血液和脑脊液培养的所有临床微生物学工作人员，无论是否接触脑膜炎奈瑟菌，都应该提供上述措施[10]。不常见病原体的疫苗接种，如考克斯体、狂犬病、伤寒、天花、炭疽、黄热病、日本脑炎、蜱传播脑炎和非商业性疫苗，应仅适用于与这些病原体或其载体直接相关的实验室工作人员。卡介苗(BCG)不常规推荐给实验室工作人员[23-24]。因患者接触和实验室暴露而有感染结核病风险的工作人员，应有潜伏性结核感染(LTBI)基线评估[10,24]。可进行 TST 和 γ 干扰素释放试验(IGRA)，两者也可以联合使用。IGRA 可用作 TST 后的随访或婴儿期接种过 BCG 疫苗患者的检测[10,24-25]。如果实验室工作人员持续暴露于结核病，应进行连续潜伏性结核感染筛查[10,24]。如果转换得以确认，员工应进行潜伏性结核感染治疗。已经感染过结核病(活动和潜伏)的实验室人员，无论是否治疗，仍然可以通过工作获得结核病，无法使用 TST 或 IGRA 监测[24]，这些工作人员根据需要或政策，通过症状或 X 线进行监测。出现潜在暴露时，所有免疫治疗、免疫力(血清)和筛选测试如 TSTs 和 IGRAs 的记录，应由机构保存[10]。

(八)MALDI-TOF MS 的安全影响

许多临床微生物学实验室已采用新的技术，以协助识别和诊断感染性疾病。从生物安全角度，特别值得关注的是基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术。MALDI-TOF MS 彻底改变了微生物的鉴定，对大多数细菌和酵母菌能够快速和准确鉴定[26]。也可进行分枝杆菌和真菌的鉴定，真菌和分枝杆菌的图谱库得到显著完善。MALDI-TOF MS 也能够快速准确地识别高致病性 BSL3 生物，如布鲁菌、土拉热弗朗西斯菌、结核分枝杆菌和球孢子菌属，然而它们识别依赖于这些生物体在参考库代表性谱图的存在和适当的样品制备程序[27-28]。用户应在使用 MALDI-TOF MS 鉴定 BSL3 生物体之前验证这一点[27-29]。如果参考库中不包括 BSL3 病原体的谱图，就不可能进行鉴定[27]。此外，对于某些生物来说，即使有适当的 BSL3 生物体谱图也可能出现高可信度识别错误，这可能因为 BSL3 与其他生物体的谱图相似(表 13-5)。

表 13-5　MALDI-TOF MS 可能会错误鉴别的具有公共卫生重要性的病原体[a]

病原鉴定	MALDI-TOF MS 可能会错误鉴定为
炭疽芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌、蕈状芽胞杆菌
类鼻疽伯克霍尔德菌 鼻疽伯克霍尔德菌	泰国伯克霍尔德菌(*Burkholderia thailandensis*)
土拉热弗朗西斯菌	费氏弗朗西斯菌
鼠疫耶尔森菌	假结核耶尔森菌
艰难拟梭菌	产孢梭菌、溶血梭菌、新梭菌

注：[a] 这些错误鉴定是由于质谱的极大相似性所致，即使用户库中有 BSL3 病原体的条目，也可能会发生这些错误鉴定。改编自参考文献[27]和[28]

在将分离株放入用于测试的 MALDI-TOF MS 仪器前，微生物学家首先要确定是否为生物危害的病原体，如果怀疑是某种生物威胁，那么实验室应考虑根据地方和国家规定进行“排除”筛查。美国微生物学会(ASM)发布了可疑生物恐怖主义实验室指南，可在线查询，网址：https://www.asm.org/index.php/science-skill-in-the-lab/sentinel-guidelines。越来越多的证据表明，MALDI-TOF MS 可在前哨环境中用于通过适当的控制和样品前处理鉴定某些生物威胁[27]。然而，因为缺乏使用 MALDI-TOF MS 的更多的经验和适当的准则，对于大多数实验室来说，怀疑有生物威胁时，在使用 MALDI-TOF MS 之前，会谨慎地使用之前概述的筛查程序。不管实验室如何鉴定，只要怀疑 BSL3 病原体感染，均应遵守相应的规则。当通过 MALDI-TOF MS 鉴定 BSL3 病原体时，尽管经过基质覆盖和激光解吸，感染性会降低，但病原体转移到目标板时可能仍然有活性，这可能导致实验室工作人员在处理目标板和维护仪器时发生暴露[29-30]。

(九)私人物品和电子设备的使用

私人物品，如钱包、手袋、电子设备、手机、平板电脑及个人电子产品，应留在实验区域之外[10]。同样，听诊器和其他医疗设备也不应携带进入和存放在实验工作区域。必须提醒工作人员注意，进入实验室后，这些物品很难去污染，成为致病和耐药病原体的潜在传染媒介。研究表明，实验室

工作人员在内的医护人员的手机容易被耐药病原体污染[32]。医护人员的寻呼机和听诊器也有类似的发现[33]。

五、可能引起实验室获得性感染的病原体

一些病原体具有引起实验室获得性感染的可能性。需要配备BSL3和BSL4防护的那些具有高致病性和传播性而又缺乏有效治疗或疫苗预防的病原体备受关注，尽管关注这些病原体，现代的实验室接触到这些病原体较为少见。尽管如此，最近仍有一些如严重急性呼吸道综合征冠状病毒（SARS-CoV）、鼠疫耶尔森菌、炭疽芽胞杆菌引起的实验室获得性感染发生的案例报道[2,13,19,34-40]。据估测，引起实验室获得性感染最常见的病原体是布鲁菌属、肠道细菌性病原体（志贺菌和肠炎沙门菌）、脑膜炎奈瑟菌和结核分枝杆菌[2,13,19,34-35,38,41]。但是，在实验室内处理的常见细菌性病原体，如链球菌、金黄色葡萄球菌、艰难拟梭菌和耐药菌（如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌）引起的实验室获得性感染的相对发病率并不清楚，可能会明显影响对发病率的预估，从而造成发病率预估的准确程度并不可信[42-43]。各地管理中缺乏实验室工作人员发生实验室获得性感染强制报告制度，而且，这些病原体也常见于社区感染，很难归结于实验室获得性感染。

（一）布鲁菌属

布鲁菌属是一组革兰阴性球杆菌，可以引起许多哺乳类动物发生布鲁菌病。过去的30年间，在许多国家有据可循的报告中，布鲁菌一直是实验室获得性感染最常见病原体[2,19,35,38,42]。在报告的实验室获得性布鲁菌病的病原体中，马耳他布鲁菌约占80%，其他还包括猪布鲁菌、流产布鲁菌和犬布鲁菌[44]。在美国，24%的实验室获得性感染是由布鲁菌属造成，导致死亡人数占到实验室获得性感染死亡人数的11%[13]。在美国进行的一项关于实验室获得性感染的调查显示实验室工作人员感染布鲁菌属的风险约是普通人群的8000倍[19]。一个较大的病例回顾显示在实验室暴露后患病率为43%，其中58%是在实验室人员直接对培养出的病原体进行操作时患病[44]。吸入操作时产生的气溶胶是实验室获得性感染最常见的途径[44]，其他的暴露形式包括接触和摄入[2]。实际上，导致感染的原因包括所有的实验室内活动，如染色、处理平皿、生化和自动化检测等[44]。有一些个案报告短暂的实验室暴露就造成获得性布鲁菌感染，据此应确保所有进入临床微生物学实验室的人员都必须登记[44]。存在没有明显实验室暴露的办公人员发生感染的报道[44]，其他具有潜在的短暂暴露的人员包括保洁人员、厂家代表、学生、住院医、设备服务人员。

鉴于布鲁菌属的高传播风险和对实验室人员的高威胁性，所有实验室人员处理临床标本时应当以可能存在布鲁菌一样的程序对待[45]。至少在对血培养、骨髓培养或无菌部位标本进行显微镜检发现革兰阴性球杆菌时，应该立刻对所有培养皿、传代培养物启动防范措施，在生物安全柜内采用正确的检测方式直至完全排除布鲁菌属[45]。确切发生布鲁菌属实验室暴露的需要特殊管理，包括暴露后预防（PEP）和血清学随访[41,45-46]。在CDC网站上可以查询到在线推荐意见（https://www.cdc.gov/brucellosis/laboratories/index.html）。

（二）脑膜炎奈瑟菌

最近的调查证实脑膜炎奈瑟菌是实验室获得性感染病原体之一。实验室工作人员发生脑膜炎奈瑟菌侵袭性感染的风险是普通人群的41～43倍[5,19,42]。有一些实验室工作人员发生严重和致死性脑膜炎球菌感染的病例记录[5,18,21,47-49]。口咽部定植的毒力株相对常见，在社区暴发时进一步增多。在一部分个体中，定植发生在侵袭性感染之后[18]。脑膜炎奈瑟菌通常从一个定植或感染个体传播到另一个个体，也可以发生在处理包含该病原体的过程中[5,13,20]。产生气溶胶的操作、处理培养皿和肉汤、鉴定试验都可以导致获得该病原体感染[2,20]。

不同实验室给予实验室工作人员预防发生脑膜炎奈瑟菌感染的推荐意见存在差异。预防主要应该聚焦于正确处理含有或可能含有脑膜炎奈瑟菌的培养物，各个实验室对暴露人员所选用的预防接种和预防用药也不同。美国免疫实践委员会提出“对于经常暴露于含有脑膜炎奈瑟菌分离株的微生物人员，推荐给予一次单剂量四价结合疫

苗"[22]。如果暴露持续，每 5 年给予 1 次加强剂量[22]，但什么是经常暴露并没有明确规定。还有使用四组分 B 群脑膜炎球菌疫苗的相似推荐[50]。加拿大、澳大利亚和欧洲指南对于使用结合疫苗还是四分组疫苗也做出了类似推荐。一些作者强烈推荐所有实验室工作人员注射通用疫苗，也推荐暴露于产生脑膜炎奈瑟菌气溶胶过程的实验室人员预防使用环丙沙星或利福平[20]。

（三）结核分枝杆菌

在过去，实验室获得结核分枝杆菌感染相对常见[2,13,51]。较早的研究显示实验室工作人员发生结核分枝杆菌感染的风险约是普通人群的 9 倍[2,42]。近来的研究发现即使实验室的防范措施不断完善，实验室获得结核分枝杆菌感染仍是一个需要关注的问题[4,25]。与大多数的实验室获得性感染一样，气溶胶是感染的最主要途径。气溶胶形成后的飞沫核中所包含的结核分枝杆菌可以在气溶胶形成过程后增加偶发感染风险[2]。Kubica 研究显示，15 个单独事件，共 291 名实验室人员暴露，共造成 80 名（占比为 27%）暴露后 TST 呈阳性，其中 8 个事件是因为定向气流不佳，5 个为生物安全柜故障，1 个为高压灭菌器故障，1 个是其他设备故障[4]。因此，对结核分枝杆菌培养物的处理必须按照正确的防范措施执行（3 级）[10]。

所有处理可能含有结核分枝杆菌的培养物和标本的实验室应该建立系统，用于监测结核分枝杆菌暴露、潜在性结核感染、发生与结核病临床症状一致的情况。实验室规程中应该包括符合结核分枝杆菌的生物安全标准[8,10]；在实验室中建立积极的文化氛围以最大限度地减少因报告潜在的暴露和事件引起的反应性恐惧；血清学指标阴性的实验室工作人员常规监测血清学指标（TST 或 IGRA）；安排出现结核病症状的人员去接受职业疗护。有确切暴露的实验室人员在暴露后需要监测 3～6 个月的 TST 或 IGRA[13]。尽管有一些国际指南推荐医务人员接种卡介苗，但是支持在医务人员和实验室工作人员中接种卡介苗可以有效预防结核病的证据很少[23,52]。美国 CDC 及其他国家类似的组织机构均已发布在医疗机构内防止结核分枝杆菌播散的指南[24,53]。

（四）土拉热弗朗西斯菌

尽管实验室内很少分离出土拉热弗朗西斯菌，但土拉热弗朗西斯菌是一种以气溶胶为媒介的，可以在实验室内传播并导致致死性疾病的病原体[2]。因为临床医生极少首先疑诊兔热病，而且，即使疑诊兔热病，患者也对医务人员无直接危险，所以临床医生忘记提醒其对实验室人员可能存在的风险[54]。20 世纪 60—70 年代的数据显示实验室获得性兔热病较常见，占实验室获得性感染的 4%～5%[2,55]。近期的许多综述提示实验室获得性兔热病的病例较前减少，但仍时有报道[19,35,38]。鉴于该病在人群中发病率的不断升高（https://www.cdc.gov/tularemia/statistics/index.html），实验室获得性兔热病病例的减少反映了实验室规范、病例管理和暴露后预防的不断完善。

暴露途径包括吸入暴露、黏膜暴露、皮肤暴露及产生的气溶胶，其中吸入暴露风险最大[2,54]。预防主要包括培训临床医生熟知该病临床表现并将疑诊报告给实验室、培训实验室人员熟知该病临床及微生物学特征[54]。推荐在所有临床实验室内建立暴露后预防的程序。不再常规推荐疫苗接种。

（五）炭疽芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌炭疽生物变种

炭疽芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌炭疽生物变种（*Bacillus cereus biovar anthracis*）可以引起人类和哺乳类动物发生炭疽[56]。炭疽芽胞杆菌是引起炭疽的最常见原因，表现为皮肤炭疽、致死性吸入性炭疽和播散性炭疽[56]。一种生物变型的含有炭疽芽胞杆菌毒力质粒（POX1 和 POX2）的蜡样芽胞杆菌（*Bacillus cereus biovar anthracis*）可以产生与炭疽芽胞杆菌毒素无差别的毒素[57-60]。炭疽芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌炭疽生物变种的芽胞可以迅速雾化并将炭疽传播给实验室人员[2]。此外，一些已发表的实验室相关的炭疽暴发均归结于生物安全和生物安保方面的差错，其中包括 2001 年发生于美国，造成 22 人感染的炭疽暴发[6,34]。7 人为吸入性炭疽，11 人是皮肤炭疽（7 人确诊，4 人疑诊）。其他较大规模的暴发发生于 1979 年的苏联，因实验室发生芽胞的意外释放造

成超过100人死亡[61]。幸运的是，职业性的实验室获得性炭疽和实验室暴露是极为罕见的，极少有文献报道[35,51,62-63]。

临床实验室鉴定和确证炭疽芽胞杆菌是一项富有挑战性的工作。之所以如此，是因为实验室人员缺乏足够的临床资料、炭疽的罕见性，以及将炭疽芽胞杆菌与蜡样芽胞杆菌族其他近缘菌种很难区分，如蜡样芽胞杆菌(*B. cereus sensu stricto*)、苏云金芽胞杆菌(*B. thuringiensis*)、蕈状芽胞杆菌(*B. mycoides*)。此外，现有数篇蜡样芽胞杆菌炭疽生物变种引起炭疽的报道[59-60]，其中有1例是在实验室获得[34]。鉴于以上挑战，完善预防职业性炭疽的规程是有难度的，需要临床医生和实验室人员通力合作。

实验室获得性炭疽的预防需要临床上高度怀疑、认真有效的临床评价及微生物学信息、正确防范培养物产生的风险直至通过克隆特征和有效检验排除炭疽芽胞杆菌。需要注意的是，MALDI-TOF MS不能用于排除炭疽芽胞杆菌。原因在于MALDI-TOF MS无法将其与蜡样芽胞杆菌加以区分，而且许多MALDI-TOF MS鉴定步骤对炭疽芽胞杆菌的芽胞灭活，并不适用[28]。实验室应该制定关于鉴定可能包含炭疽芽胞杆菌标本和对初代培养皿采取防护的规程。在笔者的实验室，任何临床医生提示有炭疽可能的标本、从皮肤或无菌部位采集的经直接革兰染色显示仅有或大部分为革兰阳性杆菌的标本，初始孵育和处理必须在生物安全柜中进行。最近，出现了由蜡样芽胞杆菌(*B. cereus sensu stricto*)引起的炭疽。蜡样芽胞杆菌复合群(*B. cereus complex*)的任何成员如果作为病因和炭疽临床表现相一致，则应考虑其可能的风险，并须进一步检测。对炭疽芽胞杆菌气溶胶发生潜在实验室暴露者给予环丙沙星或多西环素以保证暴露后预防[56,64]。经皮肤暴露者，除非同时暴露于包含芽胞的气溶胶的情况以外，无须暴露后预防[56,64]。

(六)鼻疽伯克霍尔德菌和类鼻疽伯克霍尔德菌

类鼻疽伯克霍尔德菌是引起人的类鼻疽病(melioidosis)的病原体[65]。鼻疽伯克霍尔德菌极少引起人类发病，但可以引起马和其他偶蹄动物(ungulates)出现类似疾病。该类病原体在其流行区域可以轻易地从其环境宿主形成气溶胶而引起暴发[66]。实验室获得性类鼻疽病的案例极其罕见，目前英文文献中只有2篇记载[66-68]，均与暴露于发生意外气溶胶的病原体相关。而且，近来对在临床微生物学实验室中有明显暴露于类鼻疽伯克霍尔德菌气溶胶的情形进行深入调查，并未发现出现类鼻疽病[69-70]。尽管表面上看类鼻疽伯克霍尔德菌造成职业性感染的风险很低，但还是要把类鼻疽伯克霍尔德菌看作一种生物威胁，而且对于敏感宿主来说，类鼻疽具有较高的发病率和潜在的死亡率[65,70]，因此，建议实验室有适宜的鉴定潜在分离株和疑似培养物的规程。值得注意的是，有些实验室，尤其是该菌流行地区的实验室，推荐的防范措施不如低流行区域实验室推荐的措施严格[71-72]。在现代化的实验室中，这种方法已取得一些成绩。在澳大利亚北部，尽管在临床标本中类鼻疽伯克霍尔德菌的传播较多，但并未采用更严格的防范措施，实验室人员与普通人群相比，并未发生更多的类鼻疽病，甚至是在十余年的暴露之下，也是如此[71-72]。尽管对暴露后预防的作用的支持证据极为有限，部分作者推荐对于有高暴露风险的人员和暴露风险虽低，但存在患病风险的人群给予21天的复方新诺明(多西环素或阿莫西林/克拉维酸作为二线治疗用药)[73]。这里需要重点提示的是，暴露后预防对于预防人类发病无效，而在动物模型中表现出延缓发病，也不能预防发病。暴露超过24 h，暴露后预防根本没有效果[73]。

(七)鼠疫耶尔森菌

实验室获得性感染鼠疫极为罕见，但是早在1960年，在文献中就已报道一些死亡事件[37,51]，2009年，有1名实验室人员死于鼠疫[36]。传播途径包括吸入、黏膜暴露、经皮肤暴露和产生气溶胶，其中吸入暴露风险最大[2]。预防有赖于临床医生的疑似诊断，以及培训实验室人员能够快速识别该种病原体微生物学的特征。某些区域内自然获得鼠疫的发病率高，特别是美国西南部的"四角"地区，人畜共患鼠疫的发病率高，当地实验室应该格外警惕鼠疫耶尔森菌[74]。有明显暴露于鼠疫耶尔森菌的实验室人员应该给予多西环素预防[64]。

(八)粗球孢子菌和波萨达斯球孢子菌

文献中有实验室获得性球孢子菌病的明确记

载[2,13,19,38,75]，但多数发生在1980年以前，近年来呈明显下降[13,38]。在美国，基于人群进行的研究显示实验室人员球孢子菌病的发病率与普通人群的相似，近20年来关于实验室获得性球孢子菌病的报道非常少[19,38]。这种实验室获得性疾病发病率的下降是与生物安全的提高、生物安全柜的使用、专用的真菌学实验空间相关。感染的主要途径是意外吸入病原体的培养物中的感染性关节孢子(arthroconidia)，实验室获得性感染的主要临床表现是肺粗球孢子菌病[2]。此外，还可以发生播散性粗球孢子菌病和皮肤粗球孢子菌病[2,75]。仅是开放的平皿就能释放大量的感染性关节孢子，坠落的平皿甚至可以释放出数百万的感染性关节孢子。鉴于这种空气媒介的传播方式，所有丝状真菌的培养物需要专用的实验室空间，在生物安全柜内对开放的平皿进行检测。因为粗球孢子菌属生长迅速，所以，对用于培养呼吸道标本中细菌性病原体的2～5天用培养皿内发现丝状真菌生长，特别是在室温下孵育后再检验的培养皿(如废弃平皿)，只能在生物安全柜内进行检验。对有明显暴露者可给予伊曲康唑或氟康唑预防[76-77]。

(九)其他双相真菌

经皮肤或呼吸道引起的其他实验室获得性双相真菌(组织胞浆菌、芽生菌、孢子丝菌、马尔尼菲篮状菌)感染的病例极少见，远少于实验室获得性球孢子菌病，多发生在1980年以前[2,75]。尽管这些病原体确实存在引起实验室获得性感染的风险，但是低于引起实验室获得性球孢子菌病的风险[75]。这些病原体生长较缓慢，减少了从细菌培养物中无意暴露的风险。用于预防实验室获得性球孢子菌病的注意事项同样对预防这些病原体有效。

(十)斑替枝孢瓶霉

斑替枝孢瓶霉(*Cladophialophora bantiana*)最近列入高致病性真菌中，推荐采取BSL3防护[78]。有一些病例报道，其中最值得关注的是因吸入感染性分生孢子而引起的脑部暗色丝孢菌病。该病原体具有亲神经性[78]。尽管目前尚无实验室获得性斑替枝孢瓶霉感染的病例报告，但是还是慎重起见，推荐对于所有真菌，最起码是从脑组织切片分离出的真菌，应该采取正确的防护方法以避免亲神经性真菌造成感染的风险。

(十一)考克斯体、衣原体、立克次体

伯氏考克斯体是引起Q热和心内膜炎的病原体。Q热常见于实验室获得性感染，文献中已有数百例的报道[2,79-80]。病例报道始终和使用试验动物(特别是绵羊)的研究[81]或实验室进行的细胞培养基中繁殖有关[82]。常规的获得途径主要是吸入振荡培养物后产生的气溶胶或感染的动物体液或组织(如胎盘、羊膜液、血液或其他无菌体液)产生的气溶胶[2]。感染也可以经胃肠外暴露获得[2]。处理考克斯体属的培养物时应该采用3级防护[10]。处理这些样品的实验室人员如果出现发热，应该立即加以评估。尽管暴露后预防对预防实验室获得性Q热的作用尚无定论，但是有报道显示在暴露后8～12天开始给予5天的多西环素有助于预防感染的发生[82]。尽管在美国，人用Q热疫苗尚未注册，但在某些其他国家，人用Q热疫苗已获注册，推荐用于处理该病原体的实验室人员[83]。

有实验室获得性鹦鹉热衣原体感染(鹦鹉热的病因)和沙眼衣原体感染(沙眼、性病性淋巴肉芽肿的病因)的报道[2,51]。这些报道中发生的感染多在1960年以前，之后有一些偶发病例[79]。多数实验室获得性感染是鹦鹉热，与暴露于该病原体的细胞培养物或感染的鸟及其组织相关，而暴露于感染的人类组织或标本具有潜在的危害[2]。沙眼衣原体的感染与工作人员黏膜暴露于感染标本或细胞培养物相关[2]。实验室相关暴露的预防是否有效尚无定论，但是，给予多西环素或阿奇霉素可以有效预防鹦鹉热或衣原体感染。阿奇霉素对性传播的衣原体感染的有效预防已广为人知[84]，其对实验室相关黏膜暴露也可能有效。从历史上来说，立克次体属就是最为常见的和严重的实验室获得性感染的原因，主要发生在斑疹伤寒(普氏立克次体、斑疹伤寒立克次体、恙虫病立克次体)和立氏立克次体的研究人员[2,80,85-86]。病例主要通过气溶胶暴露、皮肤损伤、实验室相关载体传播患病[51]。随着实验室现代化生物安全规程的逐步完善，近35年再无实验室获得性立克次体感染的报道[35]。

(十二)常见细菌性病原体

尽管实验室人员获得与职业相关的稀奇少见的病原体感染可以引起较多的关注，但是对实验室人员来说，最常见的细菌性病原体也会带来风险。鉴于这些感染无处不在，在缺乏强效健全的监测系统的情况下要确定获得这些感染的职业归因风险是不可能的，而在大多数司法管辖区都没有这种监测系统。

1. 化脓性链球菌 尽管实验室人员几乎每天暴露于化脓性链球菌的侵袭性或非侵袭性分离株，但这种感染的职业风险并未很好界定。有一些较早的职业获得链球菌感染病例[51,80,87]，包括死亡病例[51]，但无法界定实验室归因风险。鉴于在实验室外存在非常多的化脓性链球菌宿主，实验室内配备了适当的生物安全措施到位，所以职业获得链球菌感染的风险要低于社区获得性感染的风险。

2. 肠道细菌 沙门菌病(包括伤寒)、志贺菌病和肠出血性大肠埃希菌感染时常出现在关于实验室获得性感染的调查和文献中[2-3,13,19,79-80,88-98]。较早的研究报道伤寒在所有实验室获得性感染中占5%～10%[2,13,19,80]，近期的调查[3,19]证实实验室获得性肠道感染仍呈现偶发，包括至少1次由1位心情不佳的实验室人员故意污染松饼造成的暴发[99]。近年来，有证据显示在美国和英国发生的实验室获得性感染中，沙门菌病和志贺菌病所占的比例最高。美国在2002－2004年为48%[19]，英国在一项1994－1995年的调查为44%，而在1982－1989年为42%[19,100-104]。以前对实验室获得性肠出血性大肠埃希菌(产Vero毒素大肠埃希菌、产志贺毒素大肠埃希菌、肠出血性大肠埃希菌)感染的关注度不足，近来有证据显示这些病原体所致实验室获得性感染很常见[91-95,105]。在一项2002－2004年的调查中，微生物学实验室人员与普通人群相比，发生大肠埃希菌O157:H7感染约为8.6倍[19]。最近有一些由产毒素艰难拟梭菌引起的实验室获得性感染的报道[19,106]，其中包括毒力型NAP-1/核糖型027菌株[106]。

在对报道的绝大多数实验室相关肠道感染的病因调查中发现，原因主要是生物安全措施上的过错，包括不适当的洗手和实验台净化、标本和培养物的误操作等导致意外摄入致病菌。许多病例与使用用于培训能力测试的菌株和材料相关，这证实了缺乏经验是实验室获得性肠道感染的一个风险因素[2]。

执行有力的生物安全措施可以预防肠道感染。其中包括洗手、使用个人防护设备、正确培训处理标本和培养物、泄漏后迅速进行表面去污染，以及每日开放台面去污染[2,10]。此外，在实验室内禁止进食和贮存食物，禁止带入可被污染的私人物品，如手机、个人电子设备[10]。

尽管尚无成文的指南，如果发生明确的肠道细菌，尤其是志贺菌和肠炎沙门菌伤寒血清型的暴露，应该迅速使用正确的药物预防。在缺乏获得性耐药的情况下，可考虑使用氟喹诺酮类、复方新诺明或阿奇霉素预防。

3. 多重耐药细菌 在许多国家，多重耐药细菌，包括耐万古霉素的肠球菌、耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌、产超广谱β-内酰胺酶的肠杆菌科(ESBL-E)和耐碳青霉烯的肠杆菌(CRE)呈上升趋势。特别需要关注的是由ESBL-E和CRE引起的感染呈现急剧上升[107]。尽管实验室人员常规暴露于多重耐药菌，但无论是感染的风险还是定植流行程度都未进行系统性研究。由耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌和甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌引起的实验室获得性感染病例有据可查[16,19,43,108]。尽管没有系统性监控，以及鉴于这些病原体在社区中的普遍流行而难以建立实验室采集，目前尚无由耐万古霉素的肠球菌、ESBL-E和CRE引起的实验室获得性感染的病例报道。一般来说，被其中一种病原体造成职业性定植及后续感染的风险可以通过常规的生物安全措施和抗菌药物处置得到最大程度的减轻。

(十三)血源性病原体

与实验室感染最为相关的血源性病原体是乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)和人类免疫缺陷病毒(HIV)。在进行有效的HBV疫苗接种之前，实验室工作人员的HBV感染率比普通人群高约10倍[109-110]。在大多数国家中，为所有实验室工作人员提供疫苗接种已使观察到的病例数急剧下降，并且在进行通用疫苗接种后，实验室感染率应基本上为零。通过疫苗接种计划确保所有实验室工作人员完整的疫苗接种和足够的免疫反应来预防实验室工作人员中的HBV感染[111]。

对于未接种疫苗或疫苗反应不佳的员工,可以在发生明确的暴露后通过使用 HBV 免疫球蛋白和接种疫苗来预防疾病[111]。

实验室人员的 HCV 职业风险未知,但医护人员 HCV 感染率略高于普通人群[2]。传播可能是由于经皮或黏膜接触感染的样本(尤其是血液)所致。目前已有研究干扰素对 HCV 暴露的预防作用,这种干预的益处尚不清楚[112]。新型抗 HCV 抗病毒药物,例如,波普瑞韦(boceprevir)、索非布韦(sofosbuvir)、达沙布韦(dasabuvir)、雷迪帕韦(ledipasvir)、艾尔巴韦(elbasvir)等在对暴露的预防作用(如果有的话)是未知的。

在血源性病原体中,HIV 是目前实验室人员最为关注的。在一个医院获得性 HIV 感染的研究中,病例中有 22%～25% 是实验室工作人员[113-114]。尽管职业获得 HIV 的发病率随着防护的改善和有效的高活性抗逆转录病毒疗法有所下降,但是医院获得性 HIV 感染病例中实验室人员所占的比例很可能保持不变。暴露后预防是有效的,暴露于含有 HIV 的血液制品时强力推荐预防用药[115-116]。每个实验室应该有处理可能含有 HIV 的血液制品经皮和黏膜暴露的规程。

(十四)病毒性出血热和其他病毒

出血热病毒是一大类病毒,其中包括可能对实验室工作人员造成最大危害的沙粒病毒,布尼亚病毒和丝状病毒群。该组中毒力最强的病毒包括克里米亚-刚果出血热、埃博拉病毒、瓜纳里托病毒、胡宁病毒、拉萨病毒、马丘波病毒、马尔堡病毒及汉坦病毒。马尔堡病毒、萨比亚病毒及汉坦病毒的实验室感染已得到充分证明[34,35,117-120],已有死亡案例。还有报道由黄病毒(如西尼罗河病毒和登革热病毒)引起的实验室获得性感染[121-124]。最臭名昭著的案例可能是在德国马尔堡的一家实验室中发生的马尔堡病毒大暴发,导致 31 例感染和 7 例死亡[125]。

如果病原体可能通过检测过程(如细胞培养)传播,则潜在含有 BSL4 的病原体的标本应在具有 BSL4 能力的设施中处理[10]。2013—2016 年西非暴发的埃博拉疫情,发生几起输出性病例,需要重新考虑应如何处理可疑和确诊病例的标本,特别是提交常规血液学、生化和微生物学检测的标本。尽管推荐的操作细节不在本章范围之内,并且将取决于本地的风险评估,但推荐包括在可能的情况下为大多数常规血液学、化学和分子诊断测试提供专用的床旁(point-of-care,POC)仪器或检测,床旁疟疾测试,使用有限的和专用的测试人员以及普通的工程控制和个人防护设备。离开床旁区域的样品容器的外表面应先进行去污染,然后再将其发送到主要实验室。通常认为,使用血培养仪孵育来自疑似或确诊埃博拉病毒患者的样品是安全的,只要对血培养瓶进行去污染,戴手套操作血培养瓶,然后,在经过认证的 2 级或 3 级生物安全柜中进行传代培养即可。在风险评估之后,一些医院可能会选择使用手动监测或专用台式自动血培养仪。对于其他标本类型的微生物学检测,指南有限。这些指南见于 https://www.cdc.gov/vhf/ebola/healthcare-us/laboratories/safe-specimen-management.html。

(十五)流感病毒和其他严重呼吸道病毒性病原体

引起严重急性呼吸道感染的病原体包括各种新兴病毒和新型病毒。在实验室安全方面最受关注的是新兴的冠状病毒(即 SARS-CoV 和 MERS-CoV)和流感病毒(尤其是能够感染人类的禽流感病毒株和猪流感病毒株)。在 2004 年 SARS 暴发期间,报道了几例实验室获得性 SARS-CoV 感染病例,证实了对实验室人员的风险[35,39-40]。尽管目前尚无报道实验室获得性 MERS-CoV 感染的病例,但仍需要采取相同水平的预防措施[35]。流感对实验室工作人员来说是一种特殊情况,尽管从季节性流感病毒的临床标本中获得流感的职业风险很小[2],但获得新兴高致病性禽流感毒株的风险仍然存在,尽管非常低。虽然尚无实验室感染禽类 H5 或 H7 病毒株的报道[35],但在许多情况下也报道了自然感染,包括高死亡率的病例[126]。因此,对于可能含有严重急性呼吸道感染病原体的标本,建议采取一些附加的预防措施。尽管对特定病原体有特殊推荐,但对 MERS-CoV 的推荐通常包括将病毒培养和扩增限制在 3 级实验室,并在 2 级或 3 级生物安全柜中处理(包括核酸提取)所有潜在感染性标本。通常情况下,可以使用常规预防措施对核酸进行分子分

析、常规细菌和真菌培养,显微镜检查及包装和运输(https://www.cdc.gov/coronavirus/mers/guidelines-lab-biosafety.html)。

(十六)朊病毒

朊病毒是自我复制的蛋白质单位,可在海绵样脑病患者的某些组织中发现[7,8,127]。摄入朊病毒污染的食物可能会导致感染。通过移植受到了感染的组织,使用受污染的药物(垂体激素)和器械可以引发医源性感染[7]。已知脑、脑膜(brain covering)、脊髓、垂体组织和眼睛具有较高的传染性,脑脊液、肾、肺、脾、淋巴结和骨髓传染性较低,某些组织则无传染性(血液、血清、尿、粪便和痰)[127]。尚无实验室获得性疾病的报道,但理论上来说,是可能通过经皮暴露于感染性物质或意外摄入感染物质而发生[7]。鉴于实验室工作人员的风险非常低,并且没有任何实验室传播的证据,因此,通常认为在临床微生物学实验室中处理临床标本时采取标准 BSL2 预防措施就足够,而对处理包含朊病毒标本的唯一建议是适当的 BSL2 个人防护设备,以及出现意外泄漏或仪器污染时的去污染程序[7],包括所有推荐的个人防护设备、用于样品处理的生物安全柜,以及在处理潜在感染性材料时尽可能使用一次性吸收性表面材料和一次性消耗品[7,127]。接触到有潜在朊病毒污染材料的可重复使用的器械可通过焚化(例如,接种环)进行去污,或浸入 1 N NaOH 中,在重力置换高压灭菌器中于 121℃加热 30 min,然后,在水中清洗和冲洗,再用常规方法消毒[7,127]。对于受污染的表面和不耐热的可重复使用的仪器,将表面淹没或浸入 2 N NaOH 或 NaClO(2%氯)中,静置 1 h,除去多余的液体,并用水冲洗即可[7]。如果表面不能耐受 NaOH 或 NaClO,则彻底清洁将通过稀释去除大部分感染性。

六、实验室暴露和感染的调查和管理

实验室暴露和实验室感染的调查和管理因病原体和暴露类型的不同而有很大差异。现已发布针对特定生物暴露的指南,并为其他暴露调查提供了框架[45,64,73,77,116]。在所有临床实验室中,领导层必须协助员工接受安全教育,必须习惯于报告事故(例如,飞溅和破损)可能引起的潜在危害,而不必担心会受到惩罚[10]。实验室主任也希望鼓励工作人员主动上报可能由职业获得感染引起的常见感染,以便评估潜在的实验室获得性感染。这些感染包括蜂窝织炎和腹泻。同样,公共卫生部门在所有疾病的调查报告中应包括职业感染。

(一)实验室暴露

一般而言,实验室应考虑将任何导致黏膜或破损的皮肤暴露于潜在的感染性物质(培养物或样品)的事故或任何由气溶胶传播的病原体发生意外雾化的事故作为实验室暴露,需要进行调查。同样,对含有 BSL3 或 BSL4 病原体的培养物或标本的任何处理都应作为潜在的暴露进行调查。此外,在没有确认暴露的情况下发生的任何疑诊或确诊的实验室获得性感染,应作为实验室暴露进行调查。根据情况,调查可能会非常简短,或很广泛。

尽管没有一种方法可以适用于所有暴露,但应考虑以下步骤来调查实验室暴露。

第一步:确定暴露和感染性物质的性质。大多数实验室暴露是经皮的(例如,针刺伤害或飞溅到受损的皮肤上),经黏膜的(例如,眼部飞溅)或吸入性[10]。确定暴露的性质后,再确定感染性物质的性质,即可进行初始风险评估[2]。在临床微生物学实验室中,感染性物质可能是标本或培养物。样本中可能含有血源性病原体(例如,HIV 或 HBV)或高浓度的其他病原体(例如,痰中的结核分枝杆菌)。在许多情况下,确定样本的潜在感染可能需要进行额外的(源)检测,包括获取更多的患者样本以检测 HIV、HBV、HCV 和其他血源性病原体。在暴露于所培养的病原体的情况下,材料的性质通常是已知的,更容易确定潜在感染。任何涉及实验室暴露的所培养的病原体应保存到调查结束为止,以防需要进一步检测(例如,进行抗生素敏感性测试、分型或测序以确认实验室获得)。一旦知道暴露和病原体的性质,就可以进行初始风险评估。这些风险包含的范围很广,可以从基本无风险(例如,含有金黄色葡萄球菌的培养皿掉落)到明显且广泛的风险(例如,含有粗球孢子菌的培养皿在实验室掉落)。

第二步:评估环境去污染的必要性。如果实验室受到污染,则需去污染。表面和空气去污染

的程度取决于发生暴露的病原体和污染的类型[2]。对于空气传播的病原体，例如，结核分枝杆菌和粗球孢子菌属，应撤离受影响区域，直到充分换气后，工作人员再返回进行去污染处理[53,77]。发生气溶胶事件后，大约需要换6次空气才能从空气中去除99.9%的感染性颗粒[53]。工作人员在重新进入去污染的环境之前，必须穿戴适当的个人防护设备。所有潜在污染的表面，包括墙壁、地板、天棚、柜台和家具都应该使用合适的消毒剂去污染，并保证足够的作用时间。如果实验室中广泛散布着经空气传播的病原体，则可能有必要使用气态消毒剂（例如，多聚甲醛或过氧化氢气雾）进行全实验室去污染[77]。

第三步：确定暴露程度。确定暴露的程度和暴露者的身份对于暴露的后续管理至关重要。范围可能仅限于一个人，如针刺伤；也可能包括有限的暴露，如处理或接近马耳他布鲁菌培养物的人员；或者可能是广泛接触，如实验室中进行鼠疫耶尔森菌涡旋培养。在某些情况下，以访问记录为依据，联系相关的实验室访问人员。在大多数情况下，后续调查和管理将仅关注在此调查阶段识别出的潜在暴露个体。

第四步：确定宿主的易感性和基础状态。宿主的易感性可以通过疫苗接种记录、就职前的血清学结果，或在某些情况下既往病史。如果已知暴露人员对所述病原体具有免疫力，则通常无须进一步调查[111]。如果尚不清楚免疫状态并且可以进行检查，则应在暴露后尽快确定暴露者的血清状况。血清学可用于许多BSL3病原体，了解暴露前或暴露前后的血清状况将有助于鉴定亚临床感染（血清转化），将感染归因于实验室暴露及风险分层（以前的自然感染在某些情况下可降低实验室感染的风险）[64,77,128-129]。

第五步：在需要时给予预防。根据病原体和暴露类型，可以考虑对暴露者进行预防[45-46,64,73,77,128-129]。采取预防措施的决定需要仔细考虑暴露个体的风险和利益以及相关病原体的潜伏期。必须考虑工作人员的免疫状况、工作人员的怀孕状况、暴露时间，所涉病原体，暴露风险（例如，与接近感染性物质），以及预防的潜在益处。预防的时限应包括相关的潜伏期，并可以延长（例如，吸入炭疽的时间为60天）。表13-6总结了一些较常见的实验室暴露推荐的预防方案。

表13-6　推荐用于某些潜在的实验室获得性感染的暴露后预防用药

病原体	一线预防用药（参考文献）
布鲁菌属	多西环素和利福平（3周）[64]
弗朗西斯菌属	多西环素或环丙沙星（14天）[64]
球孢子菌属	伊曲康唑或氟康唑（6周）[76-77]
伯克霍尔德菌属	复方新诺明（21天）[73]
结核分枝杆菌	异烟肼（9个月）[a]
炭疽芽胞杆菌或蜡样芽胞杆菌	多西环素或环丙沙星（60天）[64][b]
HIV	多洛格韦（Dolutegravir）、替诺福韦和恩曲他滨（28天）[115][c]
HBV	如果个体没有接种，接种疫苗和HBV免疫球蛋白[111]
HCV	聚乙二醇干扰素α-2b[112]
考克斯体	多西环素（5天，在暴露后第8～12日）[82]
鼠疫耶尔森菌	多西环素（7天）[64]

注：[a] 仅适用于结核菌素皮肤试验或干扰素γ释放试验确认的潜在性结核感染；[b] 仅用于吸入暴露；[c] 有关完整的指南，请访问 https://www.cdc.gov/hiv/pdf/programresources/cdc-hiv-npep-guidelines.pdf。也有针对职业暴露的指南[116]，但已过时且未提及较新的抗逆转录病毒药物

第六步：为感染的变化提供临床和实验室随访。实验室暴露后，应定期对工作人员进行临床监测，重点是是否出现发热，无论是否伴有支持性感染征象。临床随访的频率和程度将根据病原体而有所不同，例如，对结核分枝杆菌暴露的随访应该包括发热，持续症状和咳嗽的变化，以及暴露后3～6个月的TST或IGRA评估[13]。除临床随访外，建议对大多数可根据血清学做出诊断的暴露进行血清学随访。血清学检查的频率将根据病原体和临床症状而不同，可以是多次（如布鲁菌暴露）或1次（1次粗球孢子菌属暴露后6周）[41,45-46,77]。

（二）实验室感染

如果怀疑实验室工作人员发生了实验室获得性感染，则需要采取其他干预措施。如果存在确切的暴露而没有发生感染，则实验室必须调查潜在的暴露，识别和调查其他暴露人员，并在有指征的情况下对暴露人员给予预防（可能暴露且仍在潜伏期内的人员）[36,41,99,105]。如果在已知暴露

后发现实验室获得性感染，则可能有必要扩大调查范围以包括更多人员，对风险较低的人员进行预防，并扩大血清学和临床随访范围以包括其他低风险人员。在可能的情况下，应获取引起工作人员发病的分离株并将其存储，以便与感染前后在实验室处理的类似微生物［包括原种(stock)病原体、对照病原体和患者菌株］进行潜在的比较分析。

(三)报告要求

实验室暴露和实验室感染必须具有既定的报告规程[10]。该规程是通过实验室管理与职业健康，以及州和地区卫生管理部门之间的合作制定。至少需要通知实验室负责人和主管、卫生官员、相关医务人员和生物安全官员。建议发生暴露的工作人员咨询临床专家[10]。如果发生与工作有关的感染，需要通知保险公司和赔偿委员会。如果实验室位于医院大楼内，特别是如果实验室工作人员与患者或医务人员有过接触，则需要通知医院感染控制人员。如有需上报到地区或国家的疾病，需要报告感染情况并进行相应调查。许多国家正在通过立法来监测实验室获得性感染和潜在的生物安全性过失。因此，根据法律，潜在的实验室获得性感染可能需要在地区或国家层面上进行特定报告。在加拿大，必须根据《人类病原体和毒素法》将所有潜在的实验室获得性感染报告给联邦卫生当局，而在美国，建立关于实验室获得性感染的集中性的国家数据库的压力越来越大[42]。

最后，当调查疑似实验室获得性感染时，参考实验室(通常是州、省或国家实验室)可提供对潜在来源病原体采用深入遗传分析技术来确认实验室获得性感染所涉菌株的指南。

与暴露或感染人员的管理并行，所有发生暴露或实验室获得性感染的实验室必须分析和调查暴露或感染的原因，并报告结果，在实践中采取所有必要的调整以防止类似事件发生[10]。该调查的部分内容将涉及信息的收集、工作人员的访谈、实验室程序的审查，以及实验室工作流程和操作的观察。这将确定导致暴露或感染的潜在因素。随后实验室应确定导致暴露的这些因素的根本原因并加以整改。整改后，实验室应确保整改措施可有效控制已确定的根本原因[10]。

参考文献请扫二维码查阅

第14章　消毒和灭菌

MATTHEW J. ARDUINO, GERALD McDONNELL

（杨志宁　译；陆玲、王辉　审校）

消毒和灭菌程序的有效使用在患者护理和实验室设置中非常重要。消毒和灭菌程序不充分可能导致医疗机构相关感染和实验室获得性感染。消毒程序和方法的选择取决于以下几个因素：有机污垢的存在和数量、微生物杀灭需求的程度、待处理表面的性质和特征、材料的相容性、表面污染和通路（如设备流明存在与否及其大小）、物品的预期用途、相关物品的处置要求和成本，以及程序的易操作性等。本章还讨论了医疗卫生环境中的消毒和灭菌相关的国际共识标准。

一、原则和定义

（一）灭菌

灭菌（sterilization）是使产品表面或内部不含活的微生物的过程。目前可广泛用于灭菌的技术[可称为"灭菌剂（sterilants）"或可灭菌的物理或化学试剂]数量有限。在实验室应用中最常用的灭菌方法是加热灭菌，可以是高压蒸汽灭菌，也可以是干热灭菌。其他灭菌过程包括电离辐射（如 γ-辐射，电子束）和基于环氧乙烷或过氧化氢等不同类型的气体灭菌[1]。对于无菌用品（如培养基）的制备、污染废弃物的处理或其他基于医疗机构设施的应用（如外科手术用医疗器械的准备），灭菌可能非常重要，并且灭菌后保持物品的无菌状态（如培养基）与灭菌过程本身同样重要。在许多情况下，要灭菌的物品须保持在无菌屏障系统中（如适用），该系统在整个过程中（如储存或运输过程中）始终保持无菌状态。灭菌过程本身通常是在特定的条件下进行，以确保目标微生物的"过度杀灭"。因此，灭菌的先决条件是灭菌剂对包括细菌、真菌、分枝杆菌、病毒、原生动物，特别是细菌芽胞（通常被认为是最不容易失活的微生物）等各种微生物表现出广谱抗菌活性。

（二）消毒

消毒（disinfection）指用于移除、破坏或灭活表面或液体中的微生物使其达到之前规定的预期使用水平的抗菌工艺[1]。注意过滤技术有可能被视为消毒流程，因为它们用物理方法去除微生物（取决于其大小或排除率），尽管其本身可能没有任何内在的抗菌活性。因此，消毒只是减少了活的微生物（或污染菌）的数量和种类，这与灭菌并不相同。虽然在一些应用中，消毒可能足以使物体表面或液体内无微生物，但这个结果并不会被承认是无菌的。消毒可以采用物理方法、化学方法或者物理与化学结合的方法来达到目的[1]。物理过程包括加热（温度通常为≥70℃/158℉）和非电离辐射，如紫外线（波长范围100～400 nm）等。广泛用于消毒的化学物质包括醇类、季铵盐化合物和氧化剂（如氯、碘和过氧化氢）[1]。值得注意的是，许多化学消毒剂通常作为制剂或混合物提供，其中包括有活性的杀菌剂和无活性的赋形剂。开发这些制剂是为了优化消毒剂产品在保质期内的活性和稳定性。消毒剂和消毒程序可以有效地对付多种类型的微生物，具体取决于抗菌剂的类型、制剂或接触条件及其使用方法。由于微生物对灭活的抗性有很大差异，不同类型消毒剂的抗菌活性也存在很大差异。因此，要确保对化学消毒剂或消毒过程提供的标签或文件进行仔细检查和跟踪，并确保其安全有效地用于预期的应用非常重要（图 14-1）[1-3]。在某些国家和某些应用中，消毒可根据已确定的抗菌活性进一步细分。在美国，"低效

消毒(low-level disinfection,LLD)”“中效消毒(intermediate-level disinfection,ILD)”和“高效消毒(high-level disinfection,HLD)”这 3 个术语被广泛应用于医疗器械领域(表 14-1)[4]。虽然这些消毒产品声明可能比较实用,但使用之前仍需仔细检查产品标签和针对特定微生物的活性,以确保进行充分的消毒。

其他描述消毒过程的术语包括“消毒剂(sanitizer)”(去除或灭活对公众健康构成威胁的微生物),“巴氏消毒(pasteurization)”(杀死可能使食物食用不安全或引起食物变质的病原微生物,通常是基于加热的过程),“杀菌剂(germicide)”(能够杀死“细菌”,但通常只针对某些类型的细菌的活性),以及“防腐剂(antisepsis/antiseptic)”。

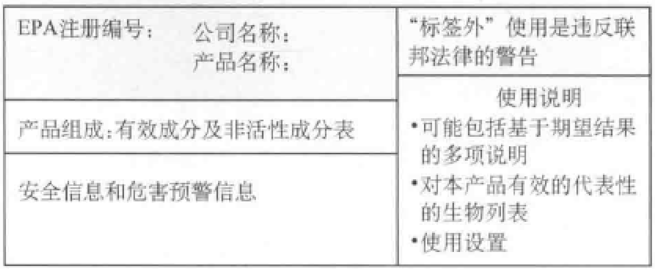


图 14-1 经美国环境保护局(EPA)注册的环境消毒剂标签的主要内容,包括以下必填信息:公司名称、产品名称和产品信息(产品成分、安全信息、使用说明)

表 14-1 基于抗微生物的活性的化学消毒剂的分类[a]

消毒剂	细菌芽胞	分枝杆菌	无包膜和小型病毒	真菌(繁殖体和真菌孢子)	细菌繁殖体[b]	包膜病毒
化学灭菌剂	+	+	+	+	+	+
高效消毒剂	±	+	+	+	+	+
中效消毒剂	−	+	±	±	+	+
低效消毒剂	−	−	−	±	+	+

注:[a] 基于参考文献[1]和[3]的数据。−. 无活性;+. 有活性;±. 活性不定。活性不定可能与组分和活性成分有关。例如,大多数 FDA 批准的高效消毒剂可杀灭芽胞(如果接触时间足够长,则为化学灭菌剂),该分类可以因标签而异。[b] 通常被称为“杀菌”声明,包括已证明对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和猪霍乱沙门菌的有效性,但对分枝杆菌或细菌芽胞无效

(三)防腐

防腐(antisepsis)是指通过洗手、外科手消毒和术前皮肤消毒[1,5]等活动对皮肤或黏膜进行独特的消毒过程。防腐剂是基于有限数量的抗菌剂,可以耐受此类用途,例如,氯己定(chlorhexidine)、三氯生(triclosan)、氯二甲苯酚(chloroxylenol)(或对氯间二甲苯酚)、碘等[1,5]。

(四)清洁

清洁(cleaning)是指去除某个表面的较大污染物到某个程度,以备进一步处理或预期用途。清洁可用物理方法将微生物(及其他相关污染物,如血液、组织、培养基等)从表面上清除,尽管其本身可能不具有任何抗菌活性。清洁可以确保消毒或灭菌过程的抗菌效果的最佳状态,通常是消毒或灭菌的必要前提。示例包括实验室设备的清洁或可重复使用的临床或外科设备和装置的清洁[1,6]。

(五)去污

去污(decontamination)指通过物理方法(如加热)和化学方法对物体表面安全化处理以备用[1,6]。必要的去污程度取决于该表面随后的使用或重复使用的用途,通常包括清洁及紧随着的一个抗菌过程(消毒或灭菌)。

二、抗性的等级

关于微生物对消毒灭菌技术的抗性程度目前已经有大量深入的研究。微生物对灭活的特异性敏感性因微生物类型和特定技术而异,其总体抗性概况如表 14-2 所示。

通常认为细菌芽胞[由芽胞杆菌(*Bacillus*)、土壤芽胞杆菌(*Geobacillus*)、艰难拟梭菌(*Clostridioides Difficile*)和梭状芽胞胞杆菌(*Clostridium species*)产生]是最具抵抗力的普通微生物,因而广泛应用于测试工业和医疗消毒过程是否有

效[如用嗜热脂肪土壤芽胞杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)的芽胞评价蒸汽灭菌]。根据标准化测试方法和法规要求，也可使用其他多种生物指示剂来测试防腐剂、消毒剂和灭菌产品声明的抗菌效果。尽管如此，某些微生物，如原生动物包囊[特别是隐孢子虫卵囊(*Cryptosporidium oocysts*)][7]、马赛分枝杆菌(*Mycobacterium massiliense*)[8]和一些非包膜病毒(nonenvelopedviruses)(如某些细小病毒)[9]对化学消毒剂类型的独特抗性已经被描述，但对加热消毒并不一定有抗性。朊病毒(*Prions*)是可传播的、错误折叠的至少可部分抵抗蛋白酶的朊病毒蛋白病如克雅病(Creutzfeldt-Jakob disease，CJD)和牛海绵状脑病(bovine spongiform encephalopathy)的病原体。由于朊病毒对传统的消毒和灭菌过程表现出独特的抗性，在这一层次中值得特别考虑[10-11]。研究证明有些成熟的灭菌方法，如基于γ-辐射和乙醚气体的灭菌方法，对于朊病毒无效，但碱和过氧化氢气体等其他方法反而有效，可能与它们包括核酸缺乏在内的独特的蛋白质性质有关[10]。

表 14-2 微生物对灭活剂(inactivation)的典型抗性一览表

微生物类型	举例	最高抗性
朊病毒	错误折叠蛋白类，相对抗蛋白酶，传播力强，可导致传染性海绵状脑病，如克-雅病	↑
细菌芽胞	嗜热脂肪土壤芽胞杆菌、蜡样芽胞杆菌、艰难拟梭菌(曾用名艰难梭菌)	
原虫和寄生蠕虫(休眠形态)	隐孢子虫(虫卵囊)、贾第虫(包囊)、蛲虫(虫卵)	
分枝杆菌	结核分枝杆菌	
非包膜病毒	细小病毒、乳头瘤病毒	
真菌(休眠形式)	曲霉孢子	
革兰阴性菌	大肠埃希菌、假单胞菌	
真菌(繁殖体)	霉菌(毛癣菌、青霉菌)和酵母菌(白念珠菌)	
革兰阳性菌	链球菌、葡萄球菌	
包膜病毒	HIV、HBV、流感病毒	最低抗性

三、监管和实践

在使用任何消毒或灭菌产品或过程时，有2个主要考虑因素：抗菌预期和安全性。抗菌预期可以取决于期望的结果，在大多数情况下是为预防感染或控制污染而减少已知(如实验室可控条件微生物的培养)或未知条件(如实验室或其他高风险的临床台面的周期性表面消毒)微生物的数量和类型。抗菌剂的声明要求一般针对特定产品，通常受政府监管。例如在美国，医疗器械消毒剂和灭菌过程的有效性由美国FDA监管[12]，而环境消毒剂则由美国环境保护署(the Environmental Protection Agency，EPA)监管注册[13]。抗菌剂的声明要求，包括其使用时间和使用条件需要符合官方分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists，AOAC)、国际和美国测试和材料协会(International and American Society for Testing and Materials，ASTM)特定推荐的、已被证实是有效的国际测试方法[14]。欧盟根据特定标准(如EN14885)[15]及国际标准化组织(the International Organization for Standardization，ISO)(如用于蒸汽灭菌的ISO 17665的灭菌工艺要求)[16]或医疗器械发展协会(the Association for the Advancement of Medical Instrumentation，AAMI)(如用于可重复使用设备的蒸汽灭菌的AAMI ST79)[17]发布的方法，或者使用类似的测试方法。某些研究型实验室则建议在拟消毒环境中验证针对特定病原体的消毒剂的有效性(如低水平污染和大量微生物高水平意外释放情况下的表面消毒)。对灭菌过程的期望相对更具体一些，即要求所有活的微生物都被灭活，但灭菌过程需设计为能够在使用条件下实现灭菌。可影响灭菌过程有效性的因素包括固体或液体废弃物循环的产生、能够限制灭菌剂接触微生物的干扰因素的存在(如蒸汽灭菌过程中的空气滞留或高浓度的血液、身体组织或废弃材料)等。一个最佳示

例就是蒸汽灭菌，该方法是将需要灭菌的负载物暴露在各种高、低不同的压力条件下，以确保在整个负载中达到正确的灭菌温度(通常超过121℃/250℉)。为了能够对规定的液体或固体负载进行灭菌(无菌物品的准备或处理医疗垃圾前病原体的灭活)，需要开发特定的蒸汽灭菌方法，使其能满足此过程的压力要求，并确保有效的最低温度和时间条件。这些设备能最大限度地降低如液体沸腾、灭菌无效和安全等各种风险。

安全性是消毒剂和灭菌剂使用过程中的第二个考虑因素，主要关注的是用户安全。所有化学消毒剂都有安全数据清单，供实验室使用前进行核查[18-19]。该清单包括如健康、火灾风险和反应性等潜在的危险，以及如何使用化学产品的建议等。由于消毒剂的生物杀灭特性，尽管其被广泛使用，但所有消毒剂都有安全风险。例如，含氯产品(如家用漂白剂)使用时会有反应性和致敏性风险；65%～80%的酒精制剂作为防腐剂和消毒剂时有可燃性。蒸汽灭菌安全方面的典型风险是在灭菌后处理热材料时可能会引起灼伤，或者各种化学加热反应发生时可能会产生有毒气体。其他方面的安全性取决于具体使用的消毒剂或灭菌剂，包括材料相容性(如对表面、可重复使用的医疗设备或仪器的损伤)和环境安全(如某些国家或州对可通过废水或空气处理的化学品的种类和数量有所限制)。

除了上述对消毒剂的标签和使用以及灭菌过程相关的法规要求外，多数国家对工人安全的要求也建立了规范。例如，1970年美国职业安全与健康法案(the United States Occupational Safety and Health Act)设立了职业安全与保健管理局(the Occupational Safety and Health Administration, OSHA)，规定并实施了安全和健康的工作条件[20]。进一步的安全建议，特别是微生物实验室安全建议，则由OSHA[19]，临床和实验室标准协会(the Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)[21]，美国生物安全协会(the American Biological Safety Association)[22]，美国卫生与人类服务部(the United States Department of Health and Human Services)[23]和世界卫生组织(the World Health Organization, WHO)[24]等组织共同发表。

四、清洁、消毒和灭菌的方法

第一步是清洁，在对经常接触的表面或工作表面，或对可重复使用的物品消毒时应该首先执行清洗这重要的一步。清洁的主要目的是清除有机污垢(organic soil)(如蛋白质物质、血液和其他潜在传染性物质、油脂等)[6,25]。有机污垢的存在有可能导致消毒和灭菌的失败。有机污垢存在多种类型，可能存在大量或多种能够阻止消毒剂的渗透或使消毒剂迅速失活的微生物[1,25]，含有卤素(如氯或碘)、季铵化合物和氧化剂(如过氧化合物)的产品也是如此。与含有较高浓度活性成分的制剂相比，含有较低浓度活性成分的制剂更容易产生这种效应。在消毒或灭菌过程中，物理清洁可能是最重要的一步，使用清洁剂或使用酶促清洗剂的全自动清洁器进行清洗，不仅可以去除有机污垢，还可以减少可能存在的微生物负载。根据要清洗的物品不同，清洗程序可包括需要擦洗或擦拭的手动清洁过程、超声波浴，甚至是全自动清洁器[1,6]。对于一般环境表面，则可以使用去垢剂-杀菌剂一步完成[6,25]。

风险和斯伯丁分类

目前医疗机构中的清洁和消毒方法很大程度上基于厄尔·斯伯丁(Earle Spaulding)的研究结果[26]。斯伯丁对感染的风险和防止感染发生所需的消毒方法(灭菌或消毒)进行了定义，他的分类方案基于设备与人体的接触情况(无菌区、黏膜、非完整皮肤和完整皮肤)，通常适用于患者护理用品和设备。这些物品可分为3类，即高度、中度、低度危险性物品[6,25]。

高度危险性物品(critical items)指通常进入身体无菌部位、血管系统或血液流经组织的物品。因为微生物污染可能会增加感染的风险，这些物品需要清洁和消毒。这类物品大部分可直接购买无菌成品，或消毒灭菌后再使用[6]。对于热敏性的物品，可使用乙醚、过氧化氢或气体等离子体系统进行灭菌，某些情况下也可以使用液性化学灭菌剂进行灭菌，但需考虑到最终物品使用前必须在不交叉污染设备的情况下充分清洁以去除残留的化学物质[6]。

中度危险性物品(semicritical items)指与黏

膜或不完整皮肤接触的物品。尽管这些物品并未被微生物污染，但由于完整的黏膜形成了一种天然屏障，通常能抵抗普通环境中的细菌芽胞的感染[12]，因而可以允许少量细菌芽胞的存在。中度危险性物品一般需要灭菌或至少进行高效消毒剂处理。高效消毒剂可以彻底消灭大多数病原体(包括细菌繁殖体、分枝杆菌、病毒和真菌)，但可能需要延长作用时间才能对细菌芽胞产生效力。通常这个过程可通过低于灭菌条件[6,12]情况下使用化学高效消毒剂或灭菌剂来实现。例如，由于呼吸治疗设备、内镜和食管测压探头等典型的治疗设备具有复杂的设计和狭长的内腔[6,27]，需要在消毒之前进行细致的清洁。清洁不足可导致再处理失败或导致患者感染或定植[27-29]。

许多研究人员认为，20 世纪 50 年代末发展起来的斯伯丁分类体系面临许多挑战[27-28]。有些人认为这个方案过于简化，并未考虑到某些类型医疗设备的设计复杂性和热敏性，也没有考虑到与生物膜和朊病毒等传染性病原体失活有关的问题。其实在某些情况下，即使考虑到风险因素，选择一种方法也会非常困难。在其他情况下，可选用典型的中度危险性设备部分直接接触患者无菌组织，同时再组合使用高度危险性的设备。

五、清洁的重要性

清洁通常是确保消毒或灭菌有效性的既重要又必要的环节。临床实践往往与许多类型的物质(如血液和其他体液、组织和医疗废物)有关，这些物质可显著影响这些过程的抗菌活性[6,30-31]。例如，包括清除洒溢在表面的血液，可再用的实验室设备上留下的残余污垢，以及在临床或外科再用的或处理后可再用的医疗设备[即清洗后进行消毒和(或)灭菌]。

尽管清洁的分析要求和确定临床可重复使用表面的清洁效果尚属于发展中的领域，但人们普遍认为，可视化的清洁程度是确保消毒和灭菌效果的最低标准。环境消毒则可能取决于消毒剂的标识。大多数消毒剂的标识数据是在残留污垢(如 5%血清)存在的情况下测试的，以确保在残留污染存在的情况下有效[12-13,15]。另一些消毒剂(通常被称为两步消毒剂)标识要求在使用该消毒剂之前对受污染的表面进行清洗(或去除大量污垢)，而其他消毒剂(一步消毒剂)可在残余污垢浓度较高的情况下显示其有效性。灭菌过程由于对微生物灭活的过度杀灭方法而可能有效，但在这种情况下也可能无法保证达到最终的无菌效果。对于可重复使用的医疗设备，尽管可以达到消毒和灭菌的抗菌要求，但由于污垢碎片的存在，目前已经有手术或其他并发症(如免疫反应)发生的相关报道[28-29,32-33]。

六、表面消毒

表面消毒通常是用来解决所谓"感染链(chain of infection)"的干预措施之一[25,34]。感染链需要病原体、宿主和环境之间的相互作用。感染若要发生传播，必须考虑诸如感染源、出口、传播方式、入口和易感人群的存在等因素。无论是设备表面还是一般环境表面，当病原微生物能够持续存在于表面时，表面消毒、手卫生和其他控制手段可以最大限度地减少病原微生物的传播[34-36]。环境表面的去污可以采用多种方法，包括使用液体化学品(消毒剂)、加热(湿热和蒸汽)、紫外线杀菌、气体和蒸汽等(图 14-2)。

(一)化学表面消毒

在美国 EPA 对用于医疗机构和其他行业的化学消毒剂进行农药管制，并且必须根据《联邦杀虫剂、杀菌剂和灭鼠剂法》的授权进行注册[2,13]。欧盟等其他地区也存在类似的期望[15]。在美国，如果某消毒剂的市场方向是特定的医疗设备(例如，血液透析机、血液透析器、柔性光纤内镜)，则该消毒剂将受到 FDA 的其他法规监管，并且如果销售用于特定设备，则该消毒剂也被视为医疗设备。因此，消毒剂不仅必须获得 EPA 注册，还必须获得 FDA 批准[37]。

化学消毒剂按其活性分类(表 14-1)，分别为高效消毒剂、中效消毒剂和低效消毒剂[12,26-27]。对于一般环境表面和工作空间的表面消毒，按照消毒的对象，可以选择使用液体低效消毒剂或中效消毒剂，选择表面消毒剂的依据包括目标微生物、材料的相容性和使用要求。EPA 官方网站上的农药注册程序根据注册产品的标签要求列出了几个清单[38]。需注意的是，列表A中的化学试剂

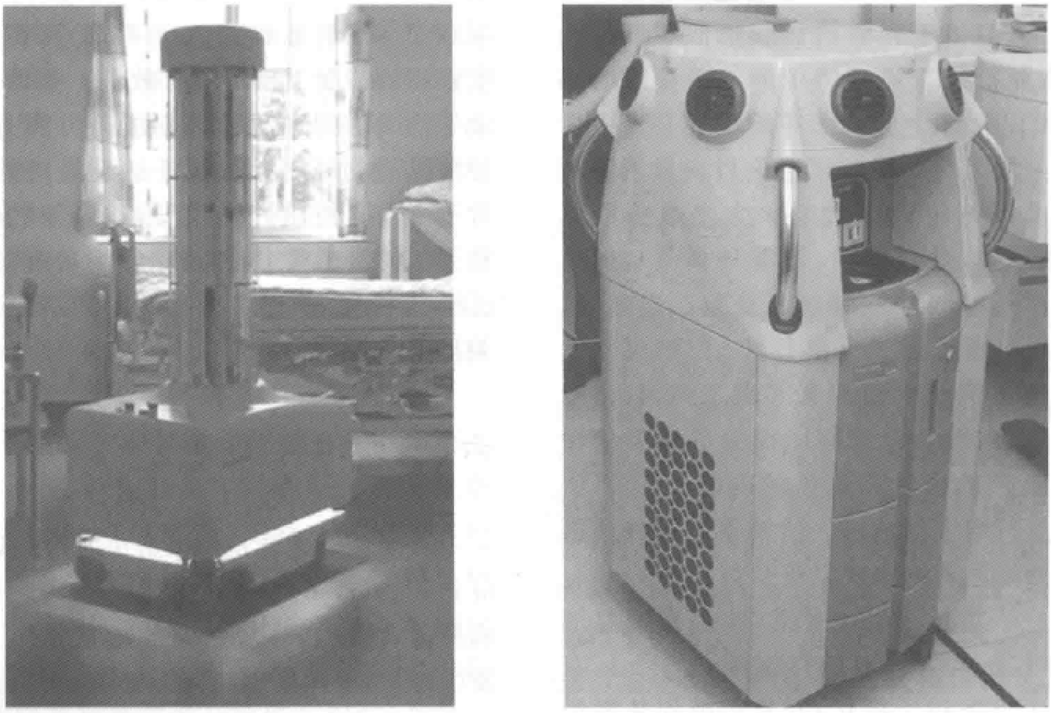


图 14-2 "非接触"消毒系统示例:便携式紫外线消毒系统(左)和过氧化氢气体发生器(右)

通常并不用于常规的表面消毒。这些化学灭菌剂呈液体剂型,通常用作某些设备的高效消毒剂,也可用于再处理设备或化学灭菌过程(如环氧乙烷)。中效消毒剂和低效消毒剂则通常用于日常用途。常用于表面消毒产品通常含有以下有效成分:季铵盐类化合物、碘伏、酚类化合物、含氯化合物、过氧乙酸和酒精(表 14-3)。这些产品使用时,都必须严格按照说明使用(说明书通常包括消毒剂的准备、使用、表面应保持湿润状态的接触时间,以及可能需要的个人防护装备),这些说明通常都列在产品标签上,也可从制造商或其他来源获得[38]。

表 14-3 化学消毒剂的活性水平

化学试剂	具有活性所需的稀释比例或浓度	活性水平
灭菌剂		
环氧乙烷	400～1200 mg/L	
甲醛	6%～8%	
戊二醛	可变	
过氧化氢	6%～30%	
过氧乙酸	可变	
二氧化氯	可变	
消毒剂		
过氧化氢	3%～6%	中效-高效
过氧乙酸	0.2%	高效
	0.08%(含 1%H_2O_2)	
戊二醛	可变	中效-高效
邻苯二甲醛	0.5%	高效
甲醛	1%～8%	高效
氯化合物(如次氯酸,次氯酸盐)	500～8000 mg/L,pH 调节至 7	中效-高效,可有杀芽胞作用
酒精(异丙醇)	60%～80%	中效
季铵化合物	0.1%～0.2%	低效
	(含酒精)	高效
酚类化合物	0.5%～3.0%	低效-中效
碘化合物	30～50 mg/L 游离碘;有效碘可达 10 000 mg	低效-中效



图 14-3 化学消毒剂制剂示例

实验室需要进行常规清洁和消毒的表面包括实验室仪器、工作台、生物安全柜、培养箱和冰箱等。这些表面都被归类为非临界表面。对大多数实验室来说，医院级别的抗结核消毒剂都是可以通用的。某些情况下，也可以使用市面上的消毒剂。一般来说，工作表面在受到污染时、切换不同的操作之间、离开工作台之前和完成工作后，应通过擦拭进行清洁和消毒。各种情况下，都应按照制造商的说明书使用。若实验室出于研究目的，产生大量细菌芽胞，则应该使用有杀芽胞功效的产品。实验室标本溢洒管理也属于表面消毒的范畴，一旦实验室发生血液和其他潜在的传染性物质或者浓缩的培养物溢洒时，应该进行标本溢洒处理程序[35,39]，此时一定要首先查看产品标签。有机污垢会干扰消毒剂的活性，可能需要分多个步骤来处理。在一项评估溢洒的研究中，研究人员使用 10^8 CFU/ml 葡萄球菌和革兰阴性杆菌进行微生物挑战试验，发现 10 000 mg/L 的次氯酸钠可减少几乎所有基质（血清、脓液，痰、脑脊液、腹水、尿、粪便和血液等）中细菌的负载达 5 个 log10 单位，但对葡萄球菌的血液无效。另一种可行的方法是首先用吸收性材料控制溢洒物，然后用漂白剂消毒[40]。Gallandat 和他的同事在没有进行预清洁步骤的情况下使用了 5000 mg/L 的次氯酸钠清洁含有大肠埃希菌和 Phi6（埃博拉病毒替代物）的溢洒物[41]，发现 15 min 的接触时间足以满足要求，而这与物表的类型、预清洁和有机物并无关系。

某研究分别将金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和大肠埃希菌置于 50%、20% 和 10% 血浆中，

比较了含氯消毒剂与酚类消毒剂的作用[42]。研究人员发现，次氯酸盐在 10 000 mg/L 的情况下均有效，如使用氯释放粉末则会产生更高的有效氯浓度，这种粉剂在含有溢洒材料时效果很好，但酚类物质和二氯异氰尿酸钠(NaDCC)可被有机物质迅速灭活[42-43]。

液体溢洒时应该首先用吸收性材料覆盖，包括使用固化剂，这样可使清理更容易些[44]。如不使用固化剂，则应往溢洒物上加入消毒剂，按说明书规定保证足够的接触时间，尽可能多地清除并及时丢弃有机物质。最后一步是对被污染的表面进行消毒。切记在清洗溢出物时要穿戴适当的个人防护装备(包括手套、防护服、面罩或护目镜等)[45]。

(二)热表面消毒

压力蒸汽灭菌由来已久，可用于表面消毒，该法作为终末消毒首次提出是在 1906 年[46]。多位研究人员曾对蒸汽用于表面消毒的情况进行过评估[47-49]。资料显示短时间暴露于蒸汽系统(3～5 s)可使测试污垢中的生物膜和病原体减少 4～5 个 $\log_{10}$ 单位。还有一些研究针对的是不同细菌(大肠埃希菌、福氏志贺菌、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌和肠沙门菌)、非包膜病毒(MS2)、真菌(白念珠菌、黑曲霉)和艰难拟梭菌的芽胞[48]。Bagattini 和其他研究人员[49]对过热的干燥饱和蒸汽消毒系统进行评估，并将其与 NaOCl 溶液的活性进行了比较，发现使用干燥饱和的蒸汽 7 min 就可消除有机污垢中接种的病原体。尽管似乎有足够的实验室数据支持，这些新技术尚未在现场得到充分的评价。另有 2 项研究对蒸汽装置在临床环境中减少微生物负载的作用进行了评估。第 1 项研究评估了蒸汽装置在医院长期护理病房的 8 个房间的使用情况。研究人员对选择的 6 个表面在蒸汽应用前后取样[47]，发现蒸汽系统不仅减少了 90% 的细菌总数，还将目标病原体降低到可检测的水平以下。第 2 项研究是在一家兽医院进行的，作者在对一台用来消毒包括犬道和犬舍地板等各种表面的蒸汽设备进行评估后观察到不锈钢水槽和层压实验室台面进行蒸汽处理后，异养菌数量可减少 99%[50]。唯一不足的是，体重秤测试场所带肋橡胶垫处理后，并未观测到病原体对数的减少。尽管水槽中的细菌数量减少 99%，但在统计学上并无显著意义。蒸汽处理确实显著减少了混凝土犬道和不锈钢水槽的细菌/真菌数量。Wood 等[50]也注意到蒸汽对其他指征菌(金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和大肠菌群)有效，污染表面的菌量减少了 75%～99%。总而言之，使用便携式蒸汽系统作为一种表面消毒的方法可能会替代化学药品，但需要更多的研究来优化其使用[50]。

(三)紫外线杀菌辐射表面消毒

能够灭活微生物的紫外光波长范围为 200～320 nm[1]。这个范围包括 UV-C(200～280 nm)和 UV-B(280～320 nm)。UV-C 辐射可用于包括水处理、废水处理、空气消毒和表面消毒等多种消毒[1,51-52]。UV-C 发光装置采用 254 nm 强辐射的低压汞灯，可用于实验室和病房的表面消毒。UV-C 灯主要作为生物安全柜清洁和消毒的补充用于实验室设置。一些医疗机构使用“非接触”紫外线设备辅助终端室清洁(房间必须首先清洁)。这些紫外线机器人已作为附加措施用于减少环境污染和医疗机构相关病原体潜在传播[1,53-54]。然而，与其他用于表面消毒和室内消毒的方法(如薄雾、雾和气)不同的是，紫外线杀菌辐射有特定的要求(灯的清洁和视线)[53]。使用紫外线反射涂料和多台设备可以缩短房间的消毒时间[54]。

七、医疗仪器和设备的消毒

消毒是处理可用于多个患者的医疗器械、仪器和设备在清洁之后的第 2 个关键步骤。这些设备主要基于前面讨论的斯伯丁分类方案[6,26]进行再处理以实现重复使用的目的。其中一些设备由于可能会接触到黏膜，至少需要高水平消毒，另一些仅接触完整皮肤的设备则不需要那么高的消毒水平。对于后者，用医院级消毒剂清洁和消毒可能就足够了。医疗器械、设备或仪器的制造商应负责提供产品的清洗和消毒说明。进入无菌腔需要灭菌的设备和器械不在本章讨论范围。

(一)一次性器械

20 世纪 70 年代，在同一个或多个患者身上重复使用一次性器械司空见惯，1977 年，美国 FDA 就这一问题提供了指导意见，医院需要对将重复

使用此类设备作为节约成本的措施[55]承担全部责任。在此之前，所有设备都被视为可反复使用。一些机构还为可重复使用的一次性设备制定了政策和程序。他们制定了清洁和灭菌的标准，只要不影响设备的物理特性或质量就可一直反复使用。2000年，美国FDA发布了一份新文件，其中涉及由医疗机构或第三方再处理企业对一次性物品进行再利用的要求[56]。这些规定所涵盖的设备包括心血管主动脉内球囊泵、腔内冠状动脉成形术导管、血压袖带、支气管镜活检钳、一次性医用剪刀和眼科刀等。在这些情况下，第三方再处理企业和医疗机构必须遵守适用于原装设备制造商的所有法规要求。他们必须在美国提交510(k)表格，以表明该设备与新设备一样安全有效，并已获得其上市前应用的批准。

20世纪90年代中期重新贴标签之前，血液透析器是重复使用一次性设备的最好示例之一，但这些透析器仅用于单个患者(不共享)[57]。透析器如果处理正确，重复使用可能安全，但如果处理不成功，有可能带来某些疾病的暴发[58]。如今，由于包括患者的安全和成本在内的许多因素，透析器的重复使用在美国已很少见[57]。

(二)医疗和实验室设备

无论是作为诊断设备还是用于研究目的，用于支持患者护理的医疗设备或用于实验室的设备都需要常规的维护和消毒。受污染的医疗设备(加热-制冷设备、柔性光纤内镜、刚性内镜、呼吸治疗设备、血液透析机、便携式X光机、血糖监测仪)往往都与感染向患者的传播有关。感染的传播通常是再处理失败的结果，在某些情况下是生产过程中的污染引起[58-61]。这些失败与病原体包括抗菌药物耐药性细菌和血源性病原体的传播有关。最近一个反复出现的示例是内镜的再处理失败，继而可能导致耐碳青霉烯酶的肠杆菌科(carbapenemresistant *Enterobacteriaceae*)和其他微生物的传播[28-30,62]。

水也有可能对医疗设备和实验室仪器造成污染，涉及的设备类型可能包括加热-制冷装置、呼吸机、连续气道正压装置、血液透析机、光纤内镜(十二指肠镜、支气管镜)[8,62]和实验室培养箱[63]。在某些情况下，水可在设备的再处理过程中用于冲洗环节，或在设备的流体通道中使用。在这些设备中可能会形成生物膜。曾有2台设备在其各自的制造工厂受到污染，导致多个国家的患者感染[59,64-65]。在某些情况下，当厂家制造医疗设备或用户使用该设备时，他们使用的是自来水而不是过滤水或纯净水[66]。曾有1例涉及脓肿分枝杆菌的假性暴发是由于培养箱的维护不足，且使用自来水对培养箱进行增湿造成污染所致[63]。对于可能被生物膜污染的设备，通常需要物理方法(如擦洗、刮擦、刷洗、超声波)来完成消毒或灭菌。在某些情况下可能需要替换新的液体通道。对医疗器械和设备进行再处理的关键是遵循制造商操作指南。

八、灭菌

在临床实验室，最广泛使用的灭菌方法是加热灭菌(特别是蒸汽灭菌)，本章将与其他灭菌方法一起简述。重要的是要记住灭菌的定义。灭菌强调的是一个控制(或验证)过程，即产品无存活微生物的过程。因此，一种灭菌方法，首先应证明它能够以一种可预见的方式灭活微生物，其采用的技术必须能够对抗广谱微生物病原体。目前已广泛确立的大多数传统的杀菌方法为加热、蒸气和辐射杀菌。灭菌过程监测通常使用被认为是最难灭活的微生物(通常是有天然的抵抗力的细菌的芽胞)(表14-2)。除此之外，选用的灭菌过程需要显示出预期的超杀效应(overkill effect)。一个典型的方法是开发一个能够证明为10^{-6}无菌保证水平(sterility assurance level，SAL)的过程。SAL的定义是单个活微生物在灭菌后留在产品上的概率。例如，SAL值为10^{-6}意味着在灭菌后，单个活的微生物存在的概率为1/1 000 000[1,16]。因此，假设开始时有1×10^{6}个细菌芽胞，如果执行杀灭6个数量级的灭菌过程，那么严格来说，已经做到了“无菌”，但没有安全阈值(safety margin)；如果进一步提高到超过6个数量级则可以增加安全系数，达到真正的10^{-6}的SAL。SAL指灭菌的可能性，并且此安全系数明显优于许多消毒方法。诸如基于加热(图14-4)或辐射的灭菌技术可以在这些规定的条件下对微生物进行快速灭菌，它们可以根据灭菌负载的性质而变化。例如，如果负载中存有空气，那么蒸汽无法渗透，与液体相比，干燥材料负载中的温度分布，以及干扰

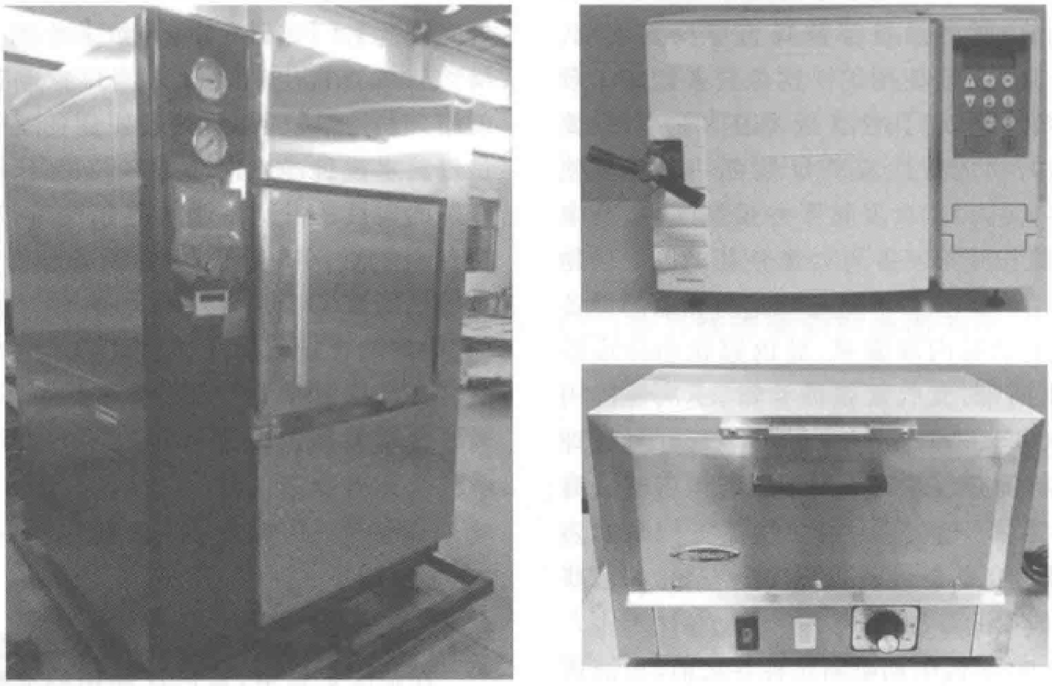


图 14-4 热灭菌器的示例：一个较大的蒸汽灭菌器（高压釜，左），一个较小的台式高压灭菌器（右上）和台式干热灭菌器（右下）

污垢（如血液和组织）的存在可以保护微生物免受气体渗透过程的影响[67-69]。因此，灭菌过程的设计、验证和使用必须符合被灭菌材料的预期用途[16]。例如，对于干净的和包装完好的可重复使用的手术器械来说，为去除被污染的固体和液体废物，使用蒸汽灭菌的方法并不合适，这种方法可能不能证明其有效性（或安全性），后者甚至可能会使干净的和受污染的材料混合起来，使得灭菌原则需要分离洁净和受污染的工作流程之一失效[3,6]。

（一）蒸汽灭菌

高温是一种行之有效的消毒和灭菌方法。高温灭菌最有效的方法是使用湿热，如使用热水/液体或蒸汽。大多数病原体在水温超过 55℃/131℉ 时就可以被灭活，但某些微生物如肠球菌[70]和军团菌属[71]和某些细小病毒[9]，需要 60～65℃（140～149℉）才可以被灭活。当温度升高到灭活的最低温度以上时，随着时间的推移，通常会出现一个对数线性的灭活率。因此，将水加热至沸点（100℃/212℉）显然是一种可靠且快速的消毒方法。然而，细菌芽胞（特别是芽胞杆菌和土壤芽胞杆菌的芽胞）已被确立为对热灭活最有抵抗力，已成为许多研究的主题[1]。非致病嗜热脂肪土壤芽胞杆菌的芽胞总体上已被证明是对热灭活最有抵抗力的微生物。根据通用气体定律，通过逐渐增加蒸汽压力的试验，发现灭活这些芽胞至少需要超过 115℃的蒸汽温度。此时微生物病原体可在几秒钟内迅速灭活。因此，嗜热脂肪土壤芽胞杆菌的芽胞被广泛用于最佳蒸汽灭菌过程的研究和验证。由于温度对构成微生物结构的蛋白质、DNA 和脂质的影响，加之蒸汽凝结到较冷的表面时能量可以大量释放，抗菌作用存在累积效应。为了达到这些暴露条件，蒸汽灭菌器（通常称为高压灭菌器）被设计成在一定压力下暴露于蒸汽（图 14-4）。典型的蒸汽灭菌过程是 121℃/250℉，15 磅/平方英寸（约 103 kPa），超过 12 min。整个过程通常包括 3 个阶段：调节阶段（确保准确温度下蒸汽渗透到整个负载以达到灭菌目的）、灭菌阶段（来实现所需的灭菌活性）及冷却阶段（或在某些情况下干燥），然后释放负载进行进一步处理（图 14-5）。调节和灭菌阶段对于正确设计以确保可以对负载进行充分灭菌来说尤为重要。排出空气的调节方法有 2 种，一种是重力置换法（蒸汽进入灭菌器顶部，通过重力将空气排出），另一种是动态法（使用真空泵，在引入蒸汽加热负载的同时将空气排出）。另一个示例是特殊设计的液体循环，它允许使用蒸汽对液体负载进行

加热和冷却，但不会导致液体在温度/压力变化时发生沸腾或爆炸。除了灭菌器和灭菌过程的设计外，还要考虑蒸汽供应的因素。如，当蒸汽太湿（因为蒸汽过饱和）或太干燥（非饱和蒸汽，更像是干热过程）而无法进行有效灭菌，或者存在可能转移到被灭菌表面或液体的化学污染（取决于所采用的特定过程）。

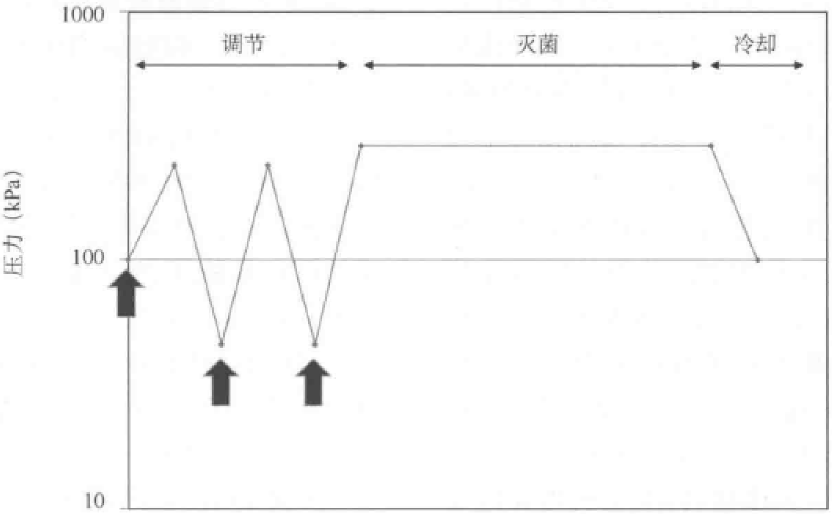


图 14-5　典型的蒸汽灭菌过程，图示为蒸汽灭菌前循环。压力（y 轴）随时间（x 轴）的变化，箭头表示引入蒸汽的时刻。注意，在调节过程中，正压脉冲（来自蒸汽的引入）之后是负压（在真空室中）；需要多个脉冲来去除空气并对负载进行加热。当引入蒸汽达到所需的温度/压力设置条件，即可进行灭菌。灭菌后，将蒸汽排出，将负载冷却取出即可

(二)干热和焚烧

在超过约 160℃/320℉的温度下，干热可以作为一种有效的灭菌方法，取决于接触时间（基于细菌芽胞灭活的研究），尽管该法不如湿热有效[1]。由于温度对生物繁殖体的结构和功能的影响，包括干燥（或除水）效应，生物繁殖体可在较低的温度下被灭活。许多生物繁殖体具有抗微生物作用可能直接归因于热量向微生物中存在的水或与细胞/病毒结构相关的水的传递，但某些类型的病毒（非包膜病毒，如细小病毒）和细菌芽胞由于其结构特点（表 14-2）[1]，可表现出更高水平的抗性。与蒸汽灭菌流程不同的是，萎缩芽胞杆菌的芽胞被认为是最耐干热灭活。与蒸汽灭菌类似，干热灭菌过程首先需要一段时间（在一定的条件下）渗透到所需的负载中，然后经过一定的灭菌时间（例如，160℃/320℉持续 120 min 或 180℃/356℉持续 30 min），再进行冷却，以确保负载在进一步处理时是安全的。在这些条件下，干热灭菌的优势是可以灭活对湿热过程特别有抗性的细菌内毒素。干热灭菌还可用于可重复使用的医疗设备以及某些实验室器具（如细胞培养或受污染的玻璃器皿）[72]。重要的是，任何要消毒或灭菌的可重复使用材料都能承受这样的温度；典型的应用包括粉剂、玻璃器皿和某些其他材料/设备的处理。

用火焚烧是一种彻底的干热灭菌方法，但这显然仅适用于被污染的废弃物或某些实验室用途（例如，可重复使用的接种环的火焰灭菌或实验室干热空气灭菌）。在焚烧过程中，污染物基本上都被烧成灰烬。在这些过程中，将污染负载放置在一个特殊设计的炉子（为提高焚烧过程效率，负载有可能需要来回移动）。根据负载大小和焚烧炉的设计，暴露于火焰的温度通常在 800～1300℃（1472～2372℉）范围。燃烧过程结束后，将负载冷却后取出即可。这是一种特别有效的微生物灭活方法，也可以减少垃圾的产生（至少减少 90%的垃圾）；不过需要关注的是焚烧炉释放的有毒物质（如二噁英）及其对环境的影响。在这些情况下，可以考虑采用收集并减少此类物质释放的减排系统，该减排系统可能会因负载而有所不同。

(三)辐射

有多种辐射方法（紫外线、γ-辐射、电子束）可用于消毒和灭菌目的[1]。它们的能量水平和灭活

微生物的能力也不尽相同。例如，包括微波或红外线在内的低能量系统本身并不被认为具有显著的广谱抗菌活性，但这些能量在转移到微生物体内的水分时却可以灭活微生物[1]。这些系统的效率取决于这些能源电磁谱内的能级和所提供的负载物或者其表面中目标微生物的情况。紫外线辐射随着能级的增加，所观察到的抗菌作用也加强，紫外线抗菌活性的最佳波长在 200～280 nm 范围(也称为 UV-C 或短程)[1,54]。众所周知，随着时间的推移，紫外线确实能有效杀灭许多细菌繁殖体和真菌，但对真菌孢子和细菌芽胞总体活性比较低。确保紫外线与被消毒的表面直接接触也很重要，例如在对层流柜进行消毒或使用紫外线系统对大型房间进行处理(图 14-2)。高能源系统，例如发射 γ 射线的放射性同位素或发射 X 射线的发生器，可广泛用于一次性材料(如塑料培养皿或其他塑料材料)或医疗设备(如人体植入物或侵入性装置)[1]的灭菌。尽管如此，出于安全风险的考虑，在临床微生物实验室或临床实践中用于抗菌目的时，很少使用这些系统。

(四)化学、低温的方法

最后一组灭菌技术是在受控情况下中使用抗菌化学品(或杀菌剂)[1,73-74]。前面已对大量的广谱抗微生物剂进行了描述，但其中能够有效对抗所有类型微生物的制剂相对较少(这是任何潜在灭菌过程的先决条件)，例如，某些类型的氧化剂(如氯、溴、过氧化氢、臭氧及过氧乙酸)和一些醛类(如甲醛和戊二醛)。其中一些杀菌剂因为具有强大的抗菌作用，不仅能够以溶液或气体的形式作为化学消毒剂，也可作为灭菌剂用于可重复使用的医疗设备和受污染的表面。在这些情况下，重要的是确保其使用过程符合其标签声明。例如，某些此类消毒剂/杀菌剂仅用于可重复使用的医疗设备(如 FDA 批准的那些特定应用)[73-74]，患者在使用这些设备前可能需要用水充分清洗(因为消毒剂残留物可能会对患者造成伤害)。此时必须使用无菌水(或其他受控水源)，以确保患者没有交叉污染或感染风险，例如可在体内反复重复用的柔性内镜(flexible endoscope)[8,29]。其他的消毒剂一般仅用于环境表面(如经 EPA 批准)[2,13,38]，可能也特别包括具有“杀菌”声明的制剂。但由于它们指的是通过对细菌芽胞活性的测试，使用时必须仔细阅读[75-76]。氯作为一种化学物质，在实验室中广泛用于消毒，但请注意，氯的有效性可随着接触时间、活性氯浓度、被处理表面或材料及干扰因素(例如，氯对污垢的存在特别敏感，如氯可与血液发生反应并使其失活)的存在而变化[77]。在实验室应用中，真正的化学灭菌过程应用并不广泛。

最广泛使用的灭菌方法是以环氧乙烷为基础，在控制湿度和温度的条件下使用，主要用于一次性医疗设备和材料的工业灭菌，用于医疗设施中的可重复使用设备则范围有限[1,6]。在这种情况下，必须对表面进行清洁并对灭菌过程进行验证，以便用这些材料或设备对给定的负载进行灭菌。在过去的 30 年里，临床使用环氧乙烷的情况有所减少，一方面是出于安全的考虑，另一方面是由于安全灭菌所需的时间较长(特别是为消除暴露过程中有毒残留物的安全性问题需要长时间曝气)[6,78]。目前广泛使用的是更安全的环氧乙烷替代物，例如，以过氧化氢气体为基础的工艺(例如等离子体或非等离子体工艺)[1,6,78]，但在这些情况下，按照标签上的说明，这些灭菌器的潜在使用存在特定的限制；在大多数情况下，这些灭菌器仅用于可重复使用的医疗设备。最后，基于甲醛或福尔马林的方法也被用于特定应用下的消毒和灭菌[1]。甲醛(CH_2O)是一种气体，福尔马林则是甲醛的液体制剂(如 40%的甲醛水溶液和低浓度的甲醇)。甲醛的液体制剂广泛用作防腐剂，特别是用于组织的固定或保存。它是一种有效的交联剂，因此可用于固定可能被或未被微生物污染的组织[1]。甲醛虽然是一种有效的固定剂，但在某些情况下，由于甲醛没有直接接触导致某些微生物可能会暴露于福尔马林的组织中存活[79]。甲醛气体(在控制温度和湿度的条件下经过一段时间)可用于实验室房间或设备(如层流柜和培养箱)的消毒[80-81]。典型的消毒过程包括安全曝气至无毒水平，可能需要数小时至数天。甲醛灭菌工艺也已开发出来(同样适用于在规定负载下可重复使用的设备和装置)，但这些工艺并没有得到广泛应用[1,81]。

(五)朊病毒

朊病毒病又称传染性海绵状脑病(transmissible spongiform encephalopathies)，是一种进行性

神经退行性疾病。这些罕见的中枢神经系统致命性疾病与朊病毒的存在有关[82-83]。人类主要的朊病毒疾病包括克-雅病，分为散发型、医源型和家族遗传型。另外四种影响人类的传染性海绵状脑病是变异型克-雅病(vCJD)、家族型致死性失眠症、散发性致死性失眠症、吉斯特曼-施特劳斯综合征。朊病毒疾病虽然比较少见，但在消毒和灭菌讨论时却很重要。不幸的是，朊病毒的失活并不明确，相关的传播已经与受污染的神经外科器械及深度电极有关[82-84]。然而，这些报道没有提供足够的关于仪器是如何清洁或灭菌的细节。此外，实验动物研究表明朊病毒失活是一个挑战[6,85-86]。

早在 20 世纪 50 年代，兽医研究就发现了朊病毒对化学和物理灭活的独特抗性。研究发现朊病毒可在神经组织中传播，接种了含有福尔马林处理过的来自感染羊跳跃病病毒(Louping-ill virus)的绵羊身体的神经组织疫苗的绵羊有 10%进展为瘙痒症[87]。其他一些研究使用羊瘙痒病、克-雅病和牛海绵状脑炎的组织匀浆，结果表明，NaOCl 和 NaOH 能够灭活朊病毒[82,86]。半致死剂量(50% lethal dose，LD50)朊病毒的对数减少量随朊病毒制剂、试剂浓度和所用化学品的浓度变化而变化；例如，有研究报道使用 13 750 mg/L 的 NaOCl 可使朊病毒完全灭活，但是在使用 1～2 mmol/L 的 NaOH 或 20 000 mg/L 的 NaOH 时，总体结果则有所不同[82,86]。在所有这些研究中，该物质的总蛋白含量和朊病毒的高效价(10^5～10^8 LD_{50}/mg)对灭活化学品构成了巨大挑战[88]。这些化学物质将成为灭活朊病毒的多步骤策略的一部分[82,86]。

也有一些关于物理失活的研究。这些研究大多集中在不同温度(134～138℃)和灭菌时间下的蒸汽灭菌，其结果也不尽相同[86,89-90]；然而，大多数实验并没有使得朊病毒完全失活。即使使用蒸汽灭菌温度在 134～138℃，不同灭菌时间也不能完全灭活组织中的高效价朊病毒[89]。当用 1 mol/L NaOH 或 NaOCl 溶液联合蒸汽灭菌处理感染组织时，动物实验可观察到朊病毒完全失活或降低到检测水平以下[86,89]。在高蛋白/组织含量和高朊病毒浓度(给予朊病毒效价每克脑组织 10^8～10^{11} LD_{50})情况下，设置不同的灭菌时间和不同的灭菌器参数都有一定的局限性。然而，当化学和物理方法联合使用时，则可达到病原体完全失活的效果。将组织浸泡在 1～2 mol/L 的 NaOH 中，并在 121℃的重力置换型高压灭菌器中作用 90 min，研究人员注意到克-雅病和羊瘙痒症的多个菌株可以完全失活[86,89]。或者，将受污染的材料浸入 NaOH 或 NaOCl 中一段时间，然后将其转移到重力置换型高压灭菌器中，动物实验可发现病毒的含量降低到低于检测限的水平。

目前的仪器再处理策略已由多个公共卫生组织出版(表 14-4)。WHO 曾组织工作组对这些研究进行了回顾，然后就其中几种可清除被朊病毒污染的外科手术器械的灭菌方法选择达成了共识[82]。工作组认为，在正常或缺氧条件下，焚烧温度接近 1000℃是最安全的灭菌方法。这种方法基本上可消除设备和材料与潜在的患者接触后带来的威胁。然而，焚烧往往不是首选手段，尤其是在美国，美国的大多数医院不再进行常规焚烧。医疗机构可以使用以下几种方法来进行去污处理，即首先使用碱性 pH 的化学物质消毒，然后进行蒸汽灭菌(表 14-4)。在对患者使用非一次性医疗器械时，应考虑组织的传染性(表 14-5 和表 14-6)。

表 14-4　用于预防朊病毒感染的医疗器械的去污和处理方法

公共卫生机构	采纳的去污方法
WHO[a]	焚烧是最安全的方式 **耐热器具：** 1. 在 1 N NaOH 中浸泡，在 121℃重力置换型高压灭菌器中加热 30 min；以清水洗净，然后进行常规消毒 2. 在 1 N NaOH 或 20 000 mg/L NaOCl 中浸泡 1 h；用清水洗净；重力置换型高压灭菌器中 121℃下进行 1 h 的高压灭菌；彻底清洗并进行常规消毒 3. 在 1 N NaOH 或 20 000 mg/L NaOCl 中浸泡 1 h；用清水洗净；转移到开放重力置换高压型灭菌器(121℃)或多孔负荷高压灭菌器(134℃)中加热 1 h；彻底清洗并进行常规消毒 4. 用 1 N NaOH 浸泡，煮沸 10 min；用清水洗净；常规消毒 5. 环境温度下 20 000 mg/L NaOCl 或 1 mol/L NaOH 浸泡 1 h；清水洗净，常规消毒 6. 在 134℃高压灭菌 18 min[b]

（续 表）

公共卫生机构	采纳的去污方法
	热敏感仪器 焚烧是最安全的方式 如果没有使用焚烧，那么使用以下方法：保持仪器在使用期间的湿润后处理；彻底清洁；消毒
CDC[c]	仪器在使用和再处理期间保持湿润 **耐热器具** 1. 焚烧是最安全的选择，但可能不符合成本效益或不切实际 2. 如果未选择焚烧，则使用上述 WHO 方法 1～3[a] **热敏仪器** 1. 焚化是最安全的选择，但可能不符合成本效益或不切实际 2. 在使用和再处理之间保持仪器湿润；彻底清洁；消毒
UK DOH[d]	**手术器械**：最大限度安全焚烧 **一次性内镜**：焚烧 **单次使用眼科器械**：保持可重复使用眼科器械的充足库存，仪器设置完整 **隐形眼镜和接触眼睛外表面的设备**：用水清洗；清洁和冲洗；浸泡，在 10 000 mg/L 的 NaOCl 中浸泡 10 min，然后清洗并干燥
PHAC[e]	为了最大程度的安全，最好是丢弃/焚化 如果不选择焚烧，则采用彻底清洁的联合方法，然后在 1 N NaOH 或 2% NaOCl 中浸泡 1 h，然后在 134℃ 下漂洗和蒸汽灭菌 60 min

注：[a] 数据来自参考文献[82]（附件三）和[130]；[b] 受污染的器械干燥之后，随后的高压灭菌将不可靠；[c] 数据来自参考文献[83]；[d] 英国卫生部；数据来自参考文献[128]；[e] 加拿大公共卫生署；数据来自参考文献[129]

表 14-5 克-雅病及变异型克-雅病感染者组织及体内物质的感染风险汇总

身体组织	克-雅病[a]	变异型克-雅病
高传染性		
大脑、脊髓	+	+
垂体、视网膜、硬脑膜	+	NT
后眼（如后玻璃体面、视网膜色素、上皮、脉络膜、视网膜下液体，视神经）	+	NT
脊髓神经节、三叉神经节	NT	+
低传染性		
脾和淋巴结	+	+
脑脊液	+	−
血液	−	+
角膜、肺、肝、肾	+	NT
周围神经、骨骼肌	+	NT
扁桃体	(−)	+
肾上腺	NT	+
骨髓	−	NT
阑尾	(−)	−
	NT	(−)
未检测到传染性		
心脏、唾液、尿、粪便、汗液、泪液、鼻黏膜、牙龈	−	NT
母乳、睾丸、精液、前列腺、甲状腺	(−)	NT
骨、牙髓	NT	NT

注：[a] 来自参考文献[128]和[130]的数据；+. 存在传染性；−. 缺乏传染性；(−). 资料有限；NT. 未经测试

表 14-6 基于组织传染性和患者类别的可重复使用器械的处理策略[a]

组织传染性水平	患者类别					
	确定诊断,极似诊断,疑似诊断		有一定风险		拟诊断	
	UK	WHO	UK	WHO	UK	WHO
高传染性 CJD 和 vCJD 中传染性 CJD 中传染性 vCJD	一次性使用,或销毁,或检疫后供同一患者重复使用	附录Ⅲ	一次性使用,或销毁,或检疫后供同一患者重复使用	附录Ⅲ	一次性使用,或销毁,或检疫后供同一患者重复使用	附录Ⅲ
低传染性 CJD	无特别注意事项		无特别注意事项	常规清洗联合消毒或灭菌	无特别注意事项	常规清洗联合消毒或灭菌
低传染性 vCJD				附录Ⅲ		附录Ⅲ
未检测到传染性		常规清洗联合消毒或灭菌		常规清洗联合消毒或灭菌		常规清洗联合消毒或灭菌

注:[a] 选自参考文献[88]。CJD. 克-雅病;vCJD. 变异型克-雅病

在灭菌过程之前去除残留的盐、蛋白质和其他有机物质,对于所有可重复使用的仪器和设备的清洗都是重要的一步,因为这些污染物质会干扰[4,6]灭菌过程。尽管也研究了其他碱性制剂,但《人类朊病毒疾病指南》(*Guidance for human prion diseases*)已经确定可采用以下 2 种碱性化学物质(例如,1 N 的 NaOH 和 20 000mg/L 的 NaOCl)对朊病毒污染物进行消毒处理[85-86,91-92]。当碱性清洗剂与已建立的灭菌或高水平消毒过程联合使用时,朊病毒感染性大大降低[86]。这些碱性清洗剂可使朊病毒蛋白(Pr^{Psc})变性,使其对蛋白酶敏感[85,92]。为预防医疗机构相关的意外传播,目前正在进一步研究对清洗和灭活朊病毒的方法[86]。

九、对灭菌剂的耐药和耐受性

微生物可以有很多机制对灭菌剂产生耐药或天然耐药,本章仅列举其中一部分[1]。在许多情况下,微生物的天然耐药性与细胞和病毒的结构、组成、和生理有关(表 14-2)。微生物对灭菌剂的相对耐药性的变化可以依赖于微生物本身、消毒剂的化学成分及消毒剂应用方法[1]。

在对化学消毒剂产生耐药过程中,微生物的相关因素可存在多种机制(抗渗性、外排泵的存在、酶的产生、生理状态),这些机制可以是微生物固有的或获得性耐药机制(如质粒介导)。在某些情况下,这种机制还可能影响抗微生物药物的敏感性[1]。

灭菌剂的抗渗性通常与微生物的外表面有关(如细菌细胞壁、病毒衣壳),固有的抗渗性主要体现在芽胞杆菌的芽胞胞衣、分枝杆菌的亲脂细胞壁、革兰阴性菌的外膜、荚膜或在生物膜存在时基质胞外聚合物质等[1]。也有关于获得性耐受性的研究报道,如在一些龟分枝杆菌-脓肿分枝杆菌复合体(*Mycobacterium chelonae-M. abscessus complex*)突变株[8,93-96]中,很可能的原因是细胞壁的改变。此外,某些革兰阴性菌获得的质粒可以改变外膜蛋白的表达,增加其对甲醛等灭菌剂的抗性[1]。

影响耐药和耐受的另一个因素与机体的生理状态有关,主要发生在具有生物膜和在营养不良环境中生长的生物体中。这些细胞的代谢趋向于不活跃,可以称为"持留菌(persister)"或"活而不可培养态细菌(viable but not culturable)"[97-98]。导致生物膜耐药和耐受的另一个因素是由于生物膜可能存在的混合物种群的性质决定[1]。重要的是,临床微生物学家需要重视这些机制,因为它们可能导致患者感染(尤其与治疗失败相关)、实验室设备(例如,水套培养箱、培养箱的加湿系统和实验室试剂水系统)和其他具有流体通道的设备或仪器潜在的生物膜的形成。清洁和消毒这些设备时需要考虑到这些因素,尤其是要考虑到已知的生物膜或处理特有病原体的风险。

十、对实验室的启示

清洁、消毒和灭菌过程是防止实验室获得性

感染的发生，防止浓集病原体释放到环境中，防止样品、培养物和化验的外部污染（环境污染或交叉污染）的整个程序的其中一环。这些安全措施包括实验室台面（一般环境表面，包括工作表面和设备）的清洁和消毒、灭菌（实验室废物和实验室用品如培养基、试剂和仪器的去污），以及手卫生[35-36]。

（一）手卫生

在实验室环境中对双手洗手去污是预防病原体传播和潜在感染的另一种方法。到目前为止只有一项在实验室环境下评估手卫生的公开研究。由于实验室获得性感染主要是通过雾化暴露和黏膜直接接触获得的，Johnston 和他的同事[99]评估了人员的手-脸接触行为，研究对象是 21 个生物安全二级（BSL2）实验室的 93 名工作人员。研究人员先后完成了以下步骤：细胞培养、细胞感染、病毒收集、试剂和培养基制备，以及组织处理，随后对 11 个手-脸接触行为的心理社会预测因素进行了调查分析。研究人员观察到研究参与者的 396 次面部触摸行为（平均每小时 2.6 次），72%的研究参与者至少触摸过自己的脸 1 次（每小时 0.2～16 次）。触摸部位按频率递减顺序排序，依次是鼻（44.9%）、前额（36.9%）、脸颊/下巴（12.5%）、口（4%）、眼（1.7%）。结果发现，不同实验室间的手-脸接触率存在差异。可预见的严重感染降低了手与脸的接触率。严重度评分量表每增加 1 个点，工作人员的面部接触就会减少 0.41 次。研究得出结论，手与脸的接触是常见的，而其作为一种主要暴露方式被很大程度上忽略。

同一首席研究者在观察本研究组戴手套和洗手情况时发现，离开实验室时，脱手套和洗手的依从性分别只有 43%和 8.2%（研究对象自报的比率为 73.7%和 35.5%）[100]。主管的行为建模和书面的洗手制度与较高的依从性相关。

如果双手受到污染，应在脱下手套后和离开实验室前进行手卫生[35-36]。目前在实验室环境中手卫生的主要方法仍然是肥皂、流动水和洗手，但在这种环境中，也鼓励人们使用酒精洗手液来养成手部卫生的习惯，如果在脱下手套后双手没有受到严重污染，可使用这些含醇手消剂。在接触过大量的抗醇类的微生物（如细菌芽胞）时，或离开实验室时，如果双手受到污染，应使用肥皂和流动水洗手。在社区环境中进行的大规模研究表明，使用普通肥皂和使用抗菌肥皂在预防感染方面没有区别[101]。最近 FDA 将所有抗菌手产品都归类为不安全有效的产品[5]。FDA 的建议对于医护人员当前在用的手产品的建议没有改变，这些产品包含以下活性成分：如酒精（乙醇或异丙基）、聚维酮碘（碘伏，povidone iodine）、苯扎氯铵（benzalkonium chloride）、苄乙氧胺氯（benzethonium chloride）、氯二甲苯酚（对氯-间-二甲苯酚）。由于现有的安全性和有效性数据不足，含有三氯生和其他 23 种活性成分的产品需要售前数据予以支持[5]。

（二）消毒剂的选择

实验室在选择常规使用的消毒剂时，应考虑以下几个因素，如实验室中常见的微生物类型、材料相容性和消毒剂的成本。仪器厂家应提供与其设备兼容的清洗剂或消毒剂清单[1]。在美国，任何情况下都应根据产品的标签说明使用经 EPA 注册的产品[38]。大多数实验室使用的是声称具有杀结核菌作用的医院通用级消毒剂。

（三）工作台面和生物安全柜的消毒

在实验室常规程序和过程中，一般工作台面通常不会受到严重污染。工作台面（如工作台、生物安全柜）应按常规进行清洁和消毒，尤其是在发生溢洒事件后。消毒剂除了开瓶可用的类型，应按照标签说明进行准备、使用和储存。工作人员应该意识到一些产品在喷洒或雾化时或通过烟雾可能会引起呼吸道刺激，应该佩戴适当的个人防护设备来防止职业暴露[35,102]。

生物安全柜的清洁和消毒也是一个物理过程，包括用消毒剂擦拭表面。如果使用腐蚀性的 NaOCl 溶液（500～8000 mg/L）[1]，其活性可能需要在适当的接触时间后中和。这可以在完成工作或发生溢洒后执行。目前在实验室环境中使用紫外线灯对生物安全柜内进行表面消毒仍然存在争议[103-104]。紫外线消毒可以作为这些表面例行清洁和消毒的补充，但随着时间的推移，紫外线的效果通常会变差。制造商通常对紫外线灯有规定的使用寿命，应该根据这些建议对灯泡进行更换。在某些应用的紫外线灯配备有监视器，可用于测量与报警设置相关联的能量输出，指示更换灯泡

的时机。通常也可在更换高效空气过滤器(high efficiency particulate air filter,HEPA)之前使用熏蒸剂(二氧化氯、甲醛、过氧化氢)对柜体进行消毒[1,38]。

(四)大面积消毒

房间、环境室和其他大型空间的消毒(通常称为生物净化)也需要考虑。在实验室空间停用后、翻新之前,或发生溢洒,或在某些类型的实验之后,可能需要室内和大型空间消毒。这项工作应由训练有素的专家佩戴适当的防护设备采用适当的工艺进行[105]。对于大多数临床微生物实验室(BSL1~BSL3)来说,最常见的表面消毒方法是将液体消毒剂直接应用于表面,通常与施药器(擦拭、微纤维布、喷雾)结合使用,其中涉及接触时间和对表面的物理擦拭。采用大面积去污或消毒方法时,消毒剂通常可通过产生雾气、蒸汽或气体作用于整个房间。这些方法在2001—2002年应对炭疽污染邮件期间被应用于建筑物的去污处理,通常使用的是甲醛、二氧化氯或过氧化氢[1,35,106]。

BSL3和BSL4实验室空间的要求对这些设施的设计有影响[23]。为便于清洁和去污,BSL3实验室的内部表面必须是防水的。进入房间的通道或其他开口(如门、通道口或气体连接器)应密封或能够密封以达到净化目的。因此,在BSL3实验室,熏蒸不是主要的消毒手段,常态下要用液体去污(包括清洗、物理去除及消毒)。应注意将墙壁、地板和天花板上的开口保持在最低限度,并"视窗密封"。除了BSL3农业实验室外,BSL3实验室通常不需要对这些密封进行验证。BSL4实验室设计要求内部表面防水和密封,便于熏蒸。这些密封需要测试和验证,以确保密封性。BSL4实验室的设计允许进行液体消毒和熏蒸,并且BSL4实验室需要定期熏蒸,以便对设备进行日常维护和认证。大型空间如房间或步入式孵化器的消毒程序多种多样,受所涉及的病原体类型、空间结构特征和空间中存在的材料的显著影响。实验室空间去污的主要方法简述如下[1,35,107]。

1. 多聚甲醛和甲醛 从历史上看,一个多世纪以前液态甲醛(液体或蒸汽)就开始用于空间和区域消毒[1]。甲醛溶液(2%~8%)可通过浸水、浸没、喷洒或浸泡的方式使用,用于土壤[108]、禽舍[109]、血液透析系统[110]和再处理医疗设备和仪器[1,6,111]的消毒。大型空间去污和生物安全柜去污主要是通过不同的方法(加热多聚甲醛晶体产生)使用甲醛进行的[1,106,112]。

出于消毒目的,接触时间建议至少30 min,以达到至少高水平消毒的目的[106]。甲醛气体用于空间消毒时一般浓度为0.3 g/ft^3,持续4 h。在煎锅中加热多聚甲醛晶体(0.3 g/ft^3)可以生成气态甲醛,从而将它们转化为甲醛气体。必须控制系统湿度以防止爆炸,在相对湿度为80%的情况下工作最佳。气体法在杀死微生物方面与液体甲醛一样有效,但需考虑到毒性问题,因为需要广泛的清洁去除甲醛中和残余[106-107]。

甲醛是一种可致癌的危险的化学物质,在使用前应采取适当的安全措施[19,106-107]。此外,在使用甲醛溶液消毒时,工作人员应参考有关处理方法的国家和地方的法规。

2. 气相过氧化氢/过氧乙酸 过氧化氢和过氧乙酸(PAA)可以蒸发为气相或应用雾气对表面进行消毒[1]。气相过氧化氢(或称过氧化氢蒸汽/过氧化氢气体,浓缩过氧化氢或干雾)和过氧乙酸气可用于消毒手套箱、生物安全柜、气雾柜及房间消毒和大面积消毒(如建筑)[113-118]。在某些情况下,当实验室使用这些气体消毒时,由于其吸附表面的特性,必须特别小心[1],Baronet等发现高温脱气(30~35℃)3~5天或采用铝包被塑料表面阻止表面吸附的发生,可有效防止残留过氧化氢干扰实验运行之间的芽胞的复活[119]。另一种用于熏蒸的过氧化合物是过氧乙酸,将过氧乙酸作为干雾或蒸汽使用,可用于农业、食品安全、制药工业,并用于净化更大的空间,如医院病房和实验室[1,114,120-121]。对病房进行雾化处理可以消除病房和相邻浴室内暴露携带者体内的艰难梭菌芽胞和病原体繁殖体。Knotzer等[120]发现,过氧乙酸能够在0.4~2.9 ml/m^{3}的速率下灭活脂质包膜病毒和非包膜病毒,持续时间为3 h。Gregersen和Roth[121]也发现过氧乙酸能够在90 m^{3}的实验室空间中对接种载体进行病毒(无法检测)消毒。总的来说,PAA气体可作为封闭区域的有效熏蒸剂,包括被炭疽杆菌芽胞污染的建筑物和地铁的消毒。

过氧化合物作为熏蒸剂已成功地广泛应用于各行各业。与使用甲醛相比,使用过氧化合物在实验室(空间、特殊的房间或生物安全柜)消毒的

优势在于，消毒完成之后几乎不需要清洗[120,122]。

3. 二氧化氯 二氧化氯气体作为熏蒸剂也被用于建筑物、房间和设备的消毒和灭菌[118,123-126]。消毒所需气体浓度约为 10 mg/L，作用时间 1～2 h。

二氧化氯具有与氯类似的广谱抗菌特性，但与氯不同的是，二氧化氯不会导致消毒副产物（如三卤甲烷）的形成，也不会与氨结合形成有机氯化物（氯胺）。二氧化氯气体难以压缩，可以储存在高压气瓶中，但通常使用基于色谱柱的固相生成系统按需生成。将二氧化氯气体稀释到特定的浓度，通常在 10～30 mg/L 之间。二氧化氯气体发生系统在合理的限度内受气体最终使用场所的大小或位置的影响可以忽略，但相对湿度需要控制，较高的湿度效果更好些[1,118,125]。这些过程可以在封闭的灭菌器或任何封闭区域内进行控制。由于二氧化氯气体保持以适度的正压和流速从气体发生器中逸出，因此，外壳不需要进行真空处理，可以对包括灭菌测试隔离器、手套箱、生物安全柜等进行消毒，甚至可以密封起来防止气体流出来消毒小型房间[1,125]。二氧化氯气体可被光迅速分解，因此，必须注意消除待消毒空间中的光源的影响。

（五）灭菌

尽管 CDC 建议对微生物废物进行现场处理，许多美国医院和医院的临床实验室依然外包他们的医疗废物处理流程。BSL3 和 BSL4 实验室的废弃物必须在运输和丢弃之前首先灭活[3,23,127]。未经处理的微生物废弃物是一种受管制的医疗废物，在美国受州和联邦法规的制约[45,127]。这意味着微生物废弃物（临床产生的或研究产生的）有可能存在从现场转移到处理设施的过程。在这种情况下，实验室流程应了解有关医疗垃圾包装和运输到处理现场（焚烧炉、高压蒸汽灭菌器或其他设备）的规则。

以往微生物废物的处理都是通过高压灭菌或焚烧来完成的。尽管各种温度和时间组合都可能有效，通常情况下，高压蒸汽灭菌将医疗垃圾暴露在 121℃下 90 min[1]。当然灭菌时间可能会随材料、容器类型、高压蒸汽灭菌器的负载和高压蒸汽灭菌器的类型而变化[1,67-68]。灭菌时间应根据制造商的说明要求，通过放置生物指示剂（其中嗜热脂肪土壤芽胞杆菌的芽胞对蒸汽灭菌最有抵抗力）和整个负载中的热电偶进行评估[16,67-68]。

十一、总结

对手、工作台面、仪器和废弃物进行消毒的目的是使它们能够安全处理并减少病原体的传播机会。清洁、消毒和灭菌是实验室做好生物安全措施和患者护理区域有效预防感染活动的关键组成部分。临床微生物学家应了解相应的监管要求，并积极参与机构感染控制和预防委员会。

MJA：本章的发现和结论仅是作者的观点，并不代表美国 CDC/美国有毒物质与疾病登记处的观点。

GM：本章的讨论是作者自己的观点。

参考文献请扫二维码查阅

第15章 生物恐怖制剂

JAMES W. SNYDER，STEVEN D. MAHLEN，SUSAN E. SHARP，MICHAEL LOEFFELHOLZ

（杨志宁 译；顾兵、王辉 审校）

人类历史上有过多次使用生物武器进行破坏性目的的记载。鉴于一些化学和生物制剂的事件，例如，20 世纪 90 年代日本邪教奥姆真理教在东京地铁系统的袭击和 2001 年发生在美国的炭疽袭击[1]，临床微生物学实验室必须做好快速排除潜在生物威胁因素的准备。在签署 1972 年《生物武器公约》(*Biological Weapons Convention*)之后，许多国家销毁了生物武器和毒素库存并终止了生物恐怖制剂的开发。《生物武器公约》禁止开发、生产或储存生物武器和毒素武器(https://www.un.org/disarmament/wmd/bio/)。但不幸的是，生物恐怖制剂在现代世界中依然很有可能发生。

一个成功的生物恐怖制剂的理想特征包括：人或动物接触后发病率高、病死率高、潜伏期短，且目标人群普遍缺乏免疫力。此外，生物恐怖制剂尤其可怕之处在于以下几点：缺乏有效的治疗；可在人与人之间传播；易于生产和播散；所致疾病至少在起始阶段，临床上难以识别或诊断。

促使有关部门去调查一个不能识别的生物恐怖事件的各方线索包括：一个高病死率疾病的大暴发、确认该病例(或一群)罹患的是一种罕见疾病、发病地区不是该疾病的流行区、该疾病在其通常流行季节之外出现、同一疾病在全国(或全球)多地同时暴发、出现了患病动物和死亡动物。根据生物恐怖制剂的分类，Ⅰ类是最具有严重威胁的制剂(表 15-1)，具有引发大规模杀伤性疾病的特点，本章将重点介绍这些生物制剂。除此之外，美国疾病预防控制中心(Centers for Disease Control and Prevention，CDC)在其官方网站也列有其他潜在的生物制剂(表 15-1；https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist.asp)。

表 15-1 HHS 和 USDA 管制的制剂和毒素[a,b]

HHS 管制制剂和毒素	两部共管的制剂和毒素	要求公共卫生总动员的其他重要制剂
相思豆毒素	炭疽芽胞杆菌*	沙门菌属
蜡样芽胞杆菌炭疽生物型*	炭疽芽胞杆菌巴斯德株	志贺菌属
肉毒神经毒素*	流产布鲁菌	大肠埃希菌 O157:H7
产神经毒素肉毒梭菌*	马耳他布鲁菌	霍乱弧菌
芋螺毒素(短的、麻痹性、并含有下列氨基酸序列的 α-芋螺毒素：$X_1CCX_2PACGX_3X_4X_5X_6CX_7$)	猪布鲁菌	
伯氏考克斯体	鼻疽伯克霍尔德菌*	
克里米亚-刚果出血热病毒	类鼻疽伯克霍尔德菌*	
蛇形菌素	亨德拉病毒	
东部马脑炎病毒	尼帕病毒	
埃博拉病毒*	裂谷热病毒	

（续 表）

HHS 管制制剂和毒素	两部共管的制剂和毒素	要求公共卫生总动员的其他重要制剂
土拉弗朗西斯菌[a]	委内瑞拉马脑炎病毒	
科萨努尔森林病毒		
拉沙热病毒		
路约病毒		
马尔堡病毒[a]		
猴痘病毒		
鄂木斯克出血热病毒		
含所有 8 个基因片段编码区任何部分、重构的、具有复制能力的 1918 年大流行性流感病毒（重建 1918 年流感病毒）		
蓖麻毒素		
普氏立克次体		
石房蛤毒素		
严重急性呼吸综合征相关冠状病毒（SARS-CoV）		
南美出血热病毒（查帕里、瓜纳瑞托、胡宁、马丘波和萨比亚病毒）		
葡萄球菌肠毒素 A、B、C、D 和 E 亚型		
T-2 毒素		
河豚毒素		
蜱传脑炎复合体病毒（远东亚型、西伯利亚亚型）		
重型天花病毒（天花病毒）[a]		
轻型天花病毒（类天花）[a]		
鼠疫耶尔森菌[a]		

注：[a] Ⅰ级管制制剂。可参阅 https://www.selectagents.gov/faq-general.html 查看Ⅰ级管制制剂的定义，或参阅 https://www.selectagents.gov/selectagentsandtoxinslist.html 查阅包括Ⅰ级管制制剂在内的制剂和毒素的更新列表。[b] 请参阅 https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist.asp

一、实验室应对网络

按照总统 39 号决策指令，美国卫生及公共服务部（the Department of Health and Human Services，HHS）和 CDC 成立了实验室应对网络（Laboratory Response Network，LRN）。这项指令于 1998 年 5 月 22 日由比尔·克林顿总统签署，把打击恐怖主义作为国家安全的头等大事和政策，也是联邦政府对包括原子能、生物和（或）化学物质和（或）大规模杀伤性武器的恐怖主义威胁或行为的回应。具体而言，该指令指出当任何恐怖分子袭击本国领土和侵犯美国公民或设施时，也不论它们是发生在国内还是国际的水域，或空域，或外国领土，美国都将竭力震慑、打击和竭力应对。美国将所有此类恐怖主义视作对国家安全潜在的威胁和犯罪行为，并将用一切适当的手段对其进行打击。在此过程中，美国将对那些实施或计划实施攻击的人继续大力推行震慑和先发制人策略，实施逮捕和起诉，或协助其他政府起诉（http://www.fas.org/irp/offdocs/pdd39.htm）。

经过美国联邦调查局（Federal Bureau of Investigation，FBI）和公共卫生实验室协会（Association of Public Health Laboratories，APHL）的合作努力，LRN 于 1999 年 8 月建立。其目的是提高和保证实验室有效地应对生物恐怖主义。LRN 致力于这一目标，加强公共卫生基础设施，提高实验室检测能力和人员配备，用高级诊断技术培训实验室人员。在美国的全部 50 个州和其他一些国家，形成了一个可以应对生物恐怖主义、化学恐怖主义以及其他的公共卫生突发事件的集成网络系统。

LRN 任务，包括“LRN 和其合作伙伴将发展、维护和加强本国和国际实验室网络。对于发

生的生物或化学恐怖主义及其他高优先级的公共卫生紧急事件，能按要求迅速进行快速检测，并及时将其信息结果安全送达"(https://emergency.cdc.gov/lrn/index.asp)。

美国估计有成千上万私人和商业实验室(包括临床、食品测试、兽医诊断和环境测试实验室)，其中一些被定为关键的哨点实验室。虽然大多数实验室不能进行确证试验，但由于他们最先接触患者，当存在可能的生物恐怖制剂时，他们能够向公共卫生官员即刻报警。这些实验室要进行一些试验以排除其他疾病，并将可疑生物恐怖样品或生物体发送到指定的LRN参考实验室进行确证试验。LRN结构如图15-1所示。

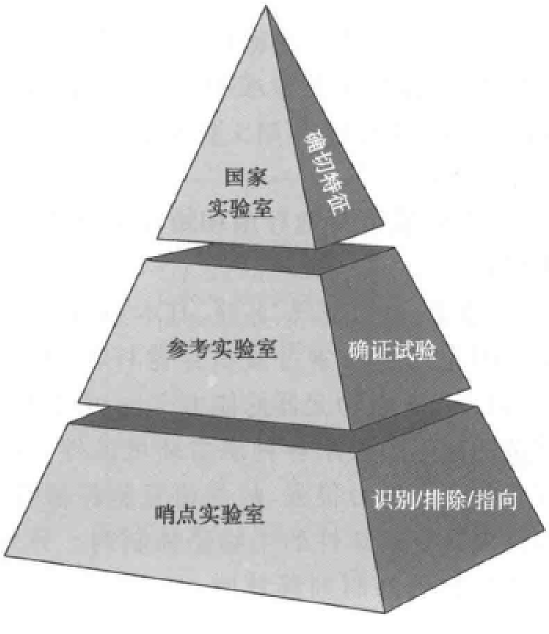


图15-1　LRN的结构

为了应对微生物学的特殊性，按照1988年颁布的《临床实验室改进修正案》(Clinical Laboratory Improvement Amendments，CLIA)标准[医疗保险和医疗补助中心(the Centers for Medicare and Medicaid Services，CMS)管理实施]对实验室应对网络哨点实验室进行认证，开展高复杂性的试验。哨点实验室可以是经美国国防部临床实验室(DoD Clinical Laboratory)改进计划认证的美国国防部实验室或者是经过美国兽医实验室诊断医师协会认可的兽医医学诊断实验室。哨点实验室检测项目包括革兰染色和下呼吸道、伤口或血液培养中的至少1种(https://www.aphl.org/aboutAPHL/publications/Documents/Definition-Sentinel-Clinical-Laboratories.pdf)。实验室应对网络参考实验室负责研究和(或)将标本转运至其国家实验室。而LRN国家实验室，包括由CDC和美国陆军感染病医学研究所运作的，都有专门的基础设施、培训点和处理高度传染性生物制剂所必需的生物安全设施。这些实验室负责特殊菌株的权威鉴定、药物敏感性试验和微生物物证检验。

为了检测生物恐怖制剂，美国微生物学会(American Society for Microbiology，ASM)已经与公共卫生实验室协会和CDC共同制定了哨点实验室检测协议，允许并督促实验室应对网络哨点实验室快速排除或将疑似生物恐怖制剂送到适当的或指定的参考实验室。ASM通过与CDC和公共卫生实验室协会合作，共同对医院和商业实验室中的微生物学家提供培训和教育资源。这些协议和其他关于生物恐怖制剂有用的信息可参见ASM官方网站：http://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines。美国病理学家学会(The College of American Pathologists，CAP)和CDC通过建立实验室应对工作能力验证，也可在促进临床和公共卫生实验室诊断能力方面发挥重要作用。此外，一些公共卫生实验室还将能力验证样品发到哨点实验室。这些能力验证项目有助于确保参与的哨点实验室有能力快速排除和(或)将生物恐怖制剂转送到适当的参考实验室。

二、联邦管制制剂项目

由于致病性生物制剂易于得到，对此需要重点关注，因而建立了联邦管制制剂项目(Federal Select Agent Program)(https://www.selectagents.gov/)。1996年《反恐怖主义和有效死刑法》(*the Antiterrorism and Effective Death Penalty Act*)(公共法104-132号)第511条指示美国卫生与公众服务部要建立一份有关威胁公共卫生和安全的生物制剂和毒素的清单，其中包括运输这些生物剂的管理程序，并对这些"管制制剂"的在岗人员提出培训要求。美国卫生与公众服务部将执行此行为的权力授权CDC实施，随之CDC建立起制剂管制计划。

2001年炭疽袭击后，美国国会通过《美国爱国

者法案》(*USA Patriot Act*)和《生物恐怖主义法案》(*the Bioterrorism Act*)。两法共同提出:限制接近管制生物制剂、增加防护和安全措施,以及严防不当的拥有和使用。除了加强美国 CDC 的监管权力,《生物恐怖主义法案》同时授予美国农业部同样的监管权力,监管对动物和植物健康或产品产生构成严重威胁的管制生物制剂。美国农业部再授权动植物卫生检疫局(APHIS)建立农业管制生物制剂计划。以上这 2 个计划构成联邦管制生物制剂计划。

通过制定、实施、执行联邦制剂管制法规(Select Agent Regulation,SAR),维护国家数据库,监督拥有、使用或转运管制生物制剂的单位,确保从事管制生物制剂工作的在岗人员接受美国联邦调查局和刑事司法信息服务部安全风险评估。联邦管制制剂项目极大地增强了管制制剂生物安全的国家监管,拥有、使用或转运管制生物制剂的单位必须使用 APHIS/CDC 的表 1 进行注册(拥有、使用或转运管制制剂和毒素注册申请 https://www.selectagents.gov/forms.html)。联邦管制制剂项目监管的生物制剂清单见表 15-1。美国 CDC 和 APHIS 至少每 2 年对该清单进行 1 次评估,确定是否需要添加或删除其中的某些项目。例如,2012 年将球孢子菌属等几个菌种从管制制剂清单中删除,最新添加的项目是 2016 年添加的炭疽蜡样芽胞杆菌。管制制剂计划要求实验室在鉴定某制剂或毒素时,必须使用 APHIS/CDC 的表 4A 在 7 天内报告鉴定结果。属于Ⅰ级管制的制剂和毒素则必须立即(在 24 h 内)通过电话、传真或电子邮件发送到管制制剂计划,已经鉴定的制剂也必须在 7 天内转移或销毁。

三、Ⅰ级管制制剂

联邦制剂管制法规于 2014 年 10 月进行了修订,指定Ⅰ级制剂为引发严重后果事件的有记载的风险高于其他管制生物制剂和毒素。Ⅰ级管制生物制剂标准如下:①能够导致大规模伤亡事件或对经济、关键基础设施或公众信心造成破坏性影响;②对公共健康和安全构成严重威胁。Ⅰ级管制生物制剂的定义,请参考网址 http://selectagents.gov/faq-general.html。查阅包括Ⅰ级管制制剂在内的制剂和毒素的更新清单请参阅(https://www.selectagents.gov/selectagentsandtoxinslist.html)。

哨点实验室不得使用包括基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)在内的自动化技术来鉴定病原体。对选定的试剂进行测试时,使用自动化鉴定系统可能导致不必要地暴露于某些潜在危险的生物。此外,包括 MALDI-TOF MS 在内的自动化鉴定系统可能无法鉴定某些病原体或给出错误的鉴定结果。例如,鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)可能被错误鉴定为假结核耶尔森菌(*Yersinia pseudotuberculosis*),类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*)可能被错误鉴定为泰国伯克霍尔德菌(*Burkholderia thailandensis*)[1-2]。

如果使用专用的管制制剂数据库,MALDI-TOF MS 可以做到更为准确[1-2]。此外,Bruker-Biotyper MALDI-TOF MS 系统还提供了与安全性相关的菌库。

1. 炭疽(炭疽芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌炭疽生物型)

(1)意义:包括美国、苏联、日本和伊拉克在内的几个国家已经探索过炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)作为生物武器的能力[3-4]。由于炭疽芽孢杆菌的孢子型极耐各种恶劣环境条件,以孢子储存在弹药中毒力很强,故炭疽芽胞杆菌有潜力成为特别具有破坏性的生物恐怖制剂。另外,炭疽作为生物恐怖制剂释放时,如果治疗延迟,死亡率通常非常高。1979 年炭疽在苏联斯维尔德洛夫斯克(现为叶卡捷琳堡)暴发,引起大量人员伤亡[5]。当时,苏联坚称炭疽暴发是由于暴露于炭疽杆菌污染的肉类引起,但自那以后有证据表明这是附近军事设施释放的气溶胶引起[5]。1993 年,日本邪教奥姆真理教在东京附近的龟户市的该教的总部大楼释放了炭疽的菌悬液[6],但因为他们使用了无毒炭疽芽胞菌菌株,该菌株不会形成荚膜,并且无毒力,这些攻击没有造成死亡事件[7-8]。另外,在 20 世纪 90 年代,伊拉克被发现生产了 8500 L 的炭疽菌液,其中 6500 L 已经武器化[9]。2001 年美国证实,曾有含炭疽芽胞的一些信封被邮寄往佛罗里达州南部、纽约市、华盛顿首府,导致发生 22 例炭疽病(11 例为吸入性,其中 5 例死亡,另外 11 例为皮肤炭疽病)[10]。尽管不能确定本次事件有多少人暴露,但有报道

称大概有 32 000 人由于可能的暴露进行过抗菌预防[10]。

2004 年，在喀麦隆和科特迪瓦的猩猩和黑猩猩身上发现了类似炭疽的疾病[11]。蜡样芽胞杆菌炭疽生物型（*B. cereus biovaranthracis*）在 2016 年被列为Ⅰ级管制制剂[12]。尽管在撰写本文时，尚没有由蜡样芽胞杆菌炭疽生物型引起的人类炭疽样疾病的报道；但由于蜡样芽胞杆菌炭疽生物型毒力决定因素，其生物威胁潜能依然存在。

（2）传播与疾病：炭疽芽胞杆菌是天然栖息于土壤中、形态大、需氧或兼性厌氧、产芽胞的革兰阳性杆菌（图 15-2*），孢子天然存在于土壤中。炭疽的 3 种主要临床类型：皮肤型（95%以上人类炭疽病属此型）、吸入型、胃肠道型[4]。吸入型（通过吸入微生物芽胞）是生物恐怖袭击采用的主要型，它可引起肺炭疽。此外，生物恐怖事件也可并发炭疽脑膜炎。任何吸入型或脑膜炎型炭疽病例都应立即怀疑为生物恐怖袭击事件。炭疽在人与人之间的传播尚未见报道[4]。

炭疽芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌炭疽生物型的鉴定非常复杂，因为这 2 种生物在羊血琼脂上均不溶血[11-12,14]。除来自刚果民主共和国的山羊菌株外，大多数蜡样芽胞杆菌炭疽生物型分离株和炭疽芽胞杆菌动力试验呈阳性[14]，而一般蜡样芽胞杆菌动力阴性。原则上，在可疑临床病例的绵羊血琼脂上具有毛玻璃样，非溶血性菌落的大型革兰阳性杆菌应转送到最近的 LRN 参考水平实验室进行确证实验（图 15-2）。更多信息参见 ASM 哨点临床微生物学实验室指南中有关炭疽章节（http://www. asm. org/index. php/guidelines/sentinelguidelines）。炭疽芽胞杆菌或蜡样芽胞杆菌炭疽生物型的检测应使用 BSL-3 规范，在生物安全等级 3（BSL-3）或 BSL-2 进行。有关炭疽芽胞杆菌的更多信息参见第 26 章。

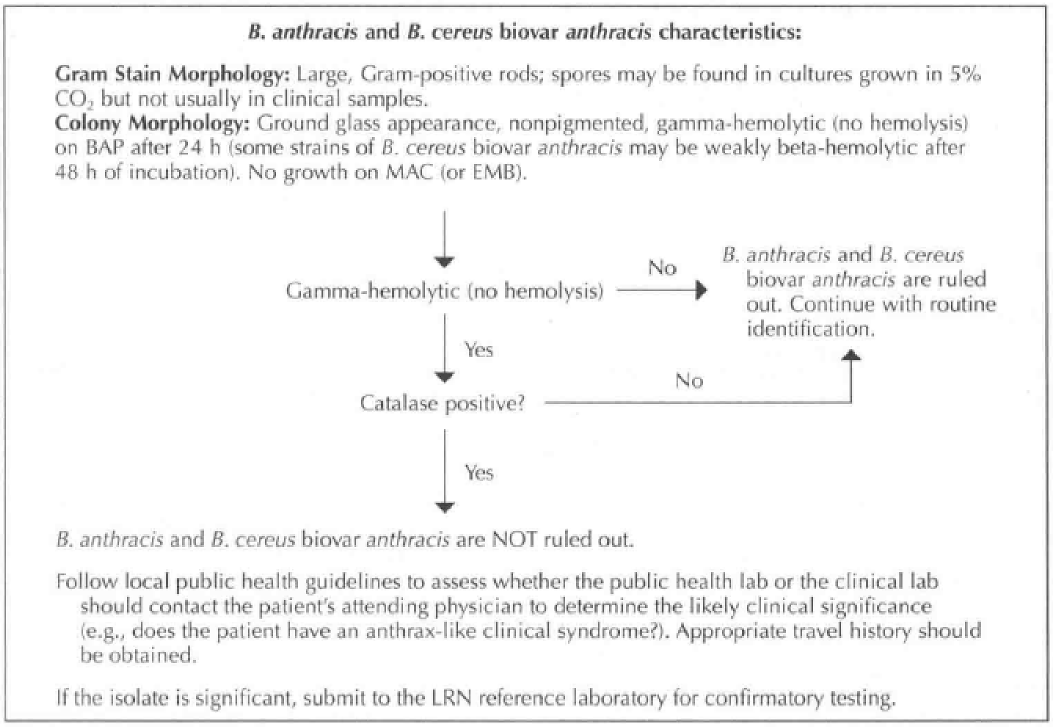


图 15-2 Sentinel-level laboratory flow chart for B. anthracis and B. cereus biovar anthracis. Note that automated identification systems, including MALDI-TOF, may misidentify potential biothreat agents. Sentinel-level laboratories should only perform necessary tests to rule out suspected biothreat agents. If a suspected biothreat agent cannot be ruled out, it should be submitted to the nearest LRN reference laboratory for confirmatory testing. Adapted from the ASM's sentinel-level clinical microbiology laboratory B. anthracis guidelines (https://www. asm. org/index. php/guidelines/sentinel-guidelines). BAP, blood agar plate; EMB, eosin-methylene blue; MAC, MacConkey agar

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

2. 肉毒毒素中毒(肉毒梭菌)

(1)意义：肉毒梭菌[以及某些丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、巴氏梭菌(*Clostridium baratii*)和阿根廷梭菌(*Clostridium argentinense*)]产生的肉毒杆菌毒素是非常有效的神经毒素[4]。这些神经毒素可作用于神经肌肉接头处和外围自主神经突触处，从而导致神经肌肉无力和自主神经功能障碍[15]。肉毒中毒的自然形式包括食源性、伤口和肠道肉毒中毒(婴儿和成人形式)[4]。通过摄入或吸入肉毒杆菌毒素，如污染的食品或输送的空气，就可制造一次使用肉毒杆菌毒素的生物恐怖事件。许多国家，包括英国、日本、美国、苏联、南非和伊拉克，在一定程度上已经开发了肉毒杆菌毒素作为生物战的武器[4,16]。此外，邪教组织奥姆真理教也曾尝试开发肉毒梭菌毒素作为生物武器。该组织曾在东京的多个地点喷洒了肉毒梭菌毒素，但幸运的是，由于他们缺乏如何正确培养该生物体并将其武器化的知识，并未导致发病或死亡[8]。

(2)传播与疾病：肉毒梭菌存在于自然环境中(土壤和水)，属厌氧性、产芽胞的革兰阳性杆菌。目前公认的肉毒杆菌毒素类型有 7 种，其中与人类疾病相关的肉毒梭菌主要产生 A、B、E 和 F 型毒素[15]。食源性肉毒中毒通常源自受污染的食品，由于食品加工方法未能破坏芽胞，该食品中的芽胞就有机会形成繁殖体，产生多种毒素。婴儿肉毒中毒通常是(但并非总是)通过食用蜂蜜而获得，伤口肉毒杆菌中毒则通常与注射黑色焦油海洛因有关[15]。与肉毒毒素生物恐怖攻击相关的临床表现为胃肠道症状(恶心、呕吐和腹泻)，随即出现神经系统体征(口干和视物模糊或复视)。重症病例症状包括吞咽困难、语音障碍和外周肌肉无力。如果波及呼吸肌，可能会导致呼吸衰竭而死亡[4]。进行肉毒梭菌毒素的检测须在 LRN 参考水平实验室进行(图 15-3)，见 ASM 哨点临床微生物实验室指南中肉毒梭菌毒素章节(http://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines)。更多肉毒梭菌相关信息参见第 53 章。

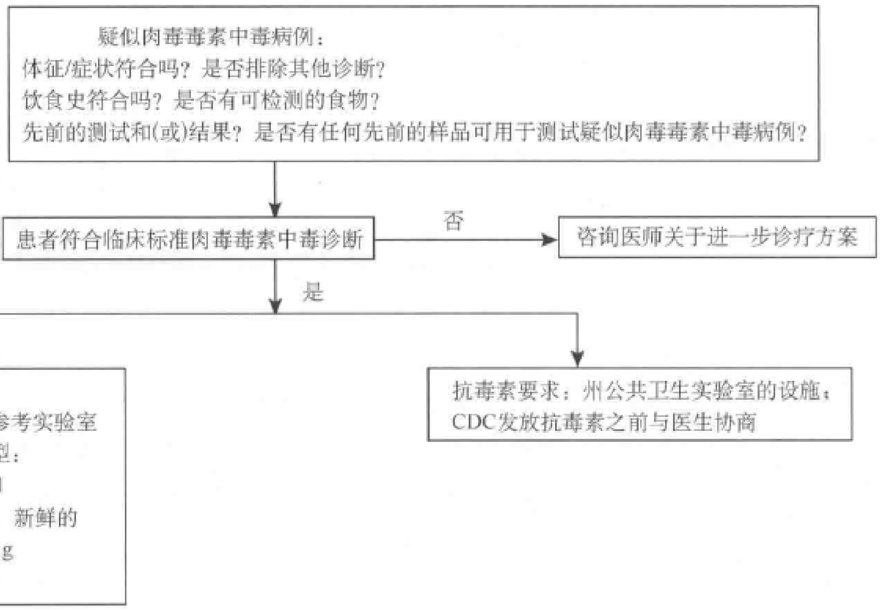


图 15-3 疑似肉毒毒素中毒病例哨点级实验室流程图。改编自 ASM 的哨点临床微生物学实验室肉毒毒素指南(https://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines)

3. 鼠疫(鼠疫耶尔森菌)

(1)意义：最早报道使用鼠疫耶尔森菌作为生物武器是 1346 年，鞑靼人入侵卡法市(今乌克兰的费奥多西亚市)，将死于瘟疫者尸体投抛到城墙上，导致瘟疫流行[17]。目前尚不清楚当时弹射瘟疫感染尸体的行为是否最终迫使该市居民屈服，毕竟也可能是老鼠将这种生物带入了城市，而当时"黑死病"正在席卷欧洲。很多国家，包括苏联、日本和美国，将此细菌发展为生物武器[4]。日本陆军 731 部队曾在中国城市投放了鼠疫感染的跳蚤，造成居民的大面积发病和死亡[4,18]。一名白人种族优越论者以欺诈手段从美国典型生物保藏

库(American Type Culture Collection,ATCC)获得鼠疫耶尔森菌培养物,这一事件促使美国国会 1996 年通过了一项关于获取、转运和使用可用于生物恐怖主义目的生物制剂法规[4]。

(2)传播与疾病:鼠疫耶尔森菌是一种形态饱满的革兰阴性球杆菌/杆菌,属于肠杆菌科细菌,生长缓慢,35℃条件下培养时,菌落可能需要 1～2 天才能观察到可见的生长。其最佳生长温度为 28℃,推荐培养时间为 5 天。鼠疫是一种全球性的人畜共患疾病,通过感染的跳蚤在动物之间传播(图 15-4*)。鼠疫有 3 型:淋巴腺型、败血症型和肺炎型。肺炎型是生物恐怖袭击突发事件中最有可能见到的疾病表现。见 ASM 哨点临床微生物学实验室指南中鼠疫章节(http://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines)。开展鼠疫耶尔森菌的检测工作应使用 BSL-3 预防措施在 BSL-3 或 BSL-2 实验室进行。有关鼠疫耶尔森菌的更多信息见第 39 章。

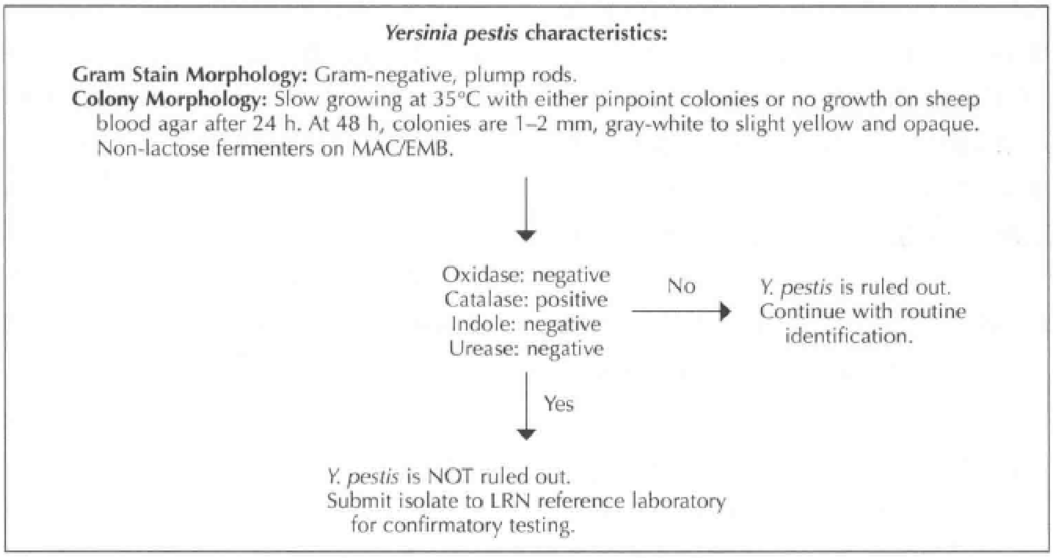


图 15-4 Sentinel-level laboratory flow chart for Y. pestis. Note that automated identification systems, including MALDI-TOF, may misidentify potential biothreat agents. Sentinel-level laboratories should only perform necessary tests to rule out suspected biothreat agents. If a suspected biothreat agent cannot be ruled out, it should be submitted to the nearest LRN reference laboratory for confirmatory testing. Adapted from the ASM's sentinel-level clinical microbiology laboratory Y. pestis guidelines (https://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines)

4. 天花[重型天花(variola major)]

(1)意义:天花(smallpox)用作生物威胁武器已有相当长的历史。在法印战争(1754－1767 年)期间,英国军队有意将天花污染的毯子送给了印第安人,以消除尽可能多的敌对人口数量[3]。在 20 世纪 50 年代和 60 年代,美国曾将天花作为一种潜在的生物威胁因子进行了相关研究[4]。肯·阿里贝克(Ken Alibek)曾是苏联大型生物武器机构 Biopreparat 的副主任,他于 1992 年叛逃到美国,最近公开了苏联如何使用天花大规模生产生物武器并用于洲际导弹[19]。时至今日,仍然有人在非法储存天花病毒及可能应用于生物恐怖活动。特别是在由于近几十年不实施常规天花疫苗接种情况下,民众已成为易感人群。

(2)传播与疾病:天花病毒属痘病毒科正痘病毒属(genus *Orthopoxvirus* in the family *Poxviridae*),它是一种体积较大的砖形病毒,(302～350) nm×(244～270) nm,由单股的线性双链 DNA 基因组构成。由于世界上已无天花相关疾病,所以即使出现一例病例也要立即怀疑为生物恐怖事件。人类传播主要通过吸入含有病毒灰尘颗粒,但也可以通过污染物(被污染的被褥或衣物)。疾病症状包括全身乏力、发热、畏寒、呕吐、头痛、背痛等症状,最终面部、手、手臂形成斑丘疹,继之蔓延到腿部,最后累及躯干。天花在未接种疫苗的人群中死亡率为 10%～30%[4]。请参阅 ASM 哨点临床微生物学实验室指南

*译者注:原著引用其他著作图,未经原作者授权翻译,故此保留原图

中关于天花的章节(http//www.asm.org/index.php/guidelines/sentinelguidelines)。有关天花的更多信息见第107章。

5. 兔热病(土拉弗朗西斯菌)

(1)意义:由于致病的吸入菌量低和极易感人群的存在,土拉弗朗西斯菌(*Francisellatularensis*)具有高度传染性,加之未经治疗患者的高发病率和高死亡率,这使得该细菌成为潜在的生物恐怖制剂。日本军队早在20世纪30—40年代便在中国满洲里为应用该生物剂作为军事武器,开始对囚犯进行实验[20]。在20世纪40—60年代,美国也同样研究了土拉弗朗西斯菌的生物威胁潜力[4,20]。1955年,美国甚至用志愿者来测试吸入生物制剂的效果[3,20]。20世纪90年代,俄罗斯开发出耐抗生素和耐疫苗的土拉弗朗西斯菌菌株[4,20]。

(2)传播与疾病:土拉弗朗西斯菌是一种极小、苛养、多形性革兰阴性球杆菌。该菌通常在巧克力琼脂上比在绵羊血琼脂上生长更好,并且在麦康凯琼脂上不生长。土拉弗朗西斯菌生长不需要X和V因子、氧化酶阴性、触酶阴性(或弱阳性)、β-内酰胺酶阳性(图15-5)。吸入含有土拉弗朗西斯菌的气溶胶颗粒可导致感染肺型兔热病(Tularemia),它是与生物恐怖袭击相关的主要疾病形式,但患者也可能表现出其他形式的兔热病(如溃疡腺型、腺型、眼腺型、咽型和伤寒型)。肺炎性兔热病的症状有发热、干咳和胸痛等[4,21]。土拉弗朗西斯菌土拉亚种(A型)和全北极亚种(B型)是临床引起兔热病的2个重要亚种。请参阅ASM哨点临床微生物学实验室指南中土拉弗朗西斯菌章节(http://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines)。实验室工作人员是感染兔热病的危险人群,可疑分离株的操作应采用BSL-3预防措施在BSL-3或BSL-2实验室进行。有关土拉弗朗西斯菌的更多信息见第46章。

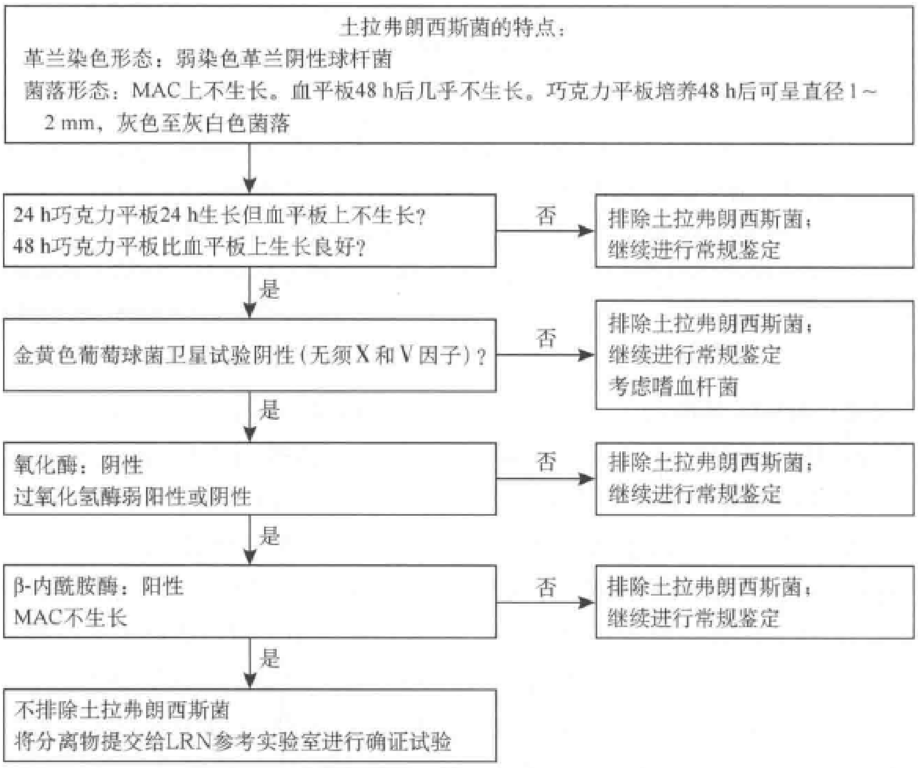


图15-5 土拉弗朗西斯菌的哨点级实验室流程图。请注意,包括MALDI-TOF在内的自动鉴定系统有误判潜在的生物威胁因子的可能。哨点实验室只开展以排除可疑的生物威胁因子的必要的测试。如果遇到不能鉴定的可疑生物威胁剂,应将其提交给最近的LRN参考实验室进行确证实验。改编自ASM的哨点临床微生物实验室土拉弗朗西斯菌指南(https://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines)

6. 出血热病毒引起的疾病

(1)意义:出血热病毒(Hemorrhagic Fever Viruses,HFVs)包括 4 个科:沙粒病毒科(Arenaviridae)[来自南美的拉沙热病毒(Lassa fever virus)、查帕里病毒(Chaparevirus)、瓜纳里托病毒(Guanaritovirus)、朱宁病毒(Junin virus)、马丘波病毒(Machupo virus)和萨比亚病毒(Sabiavirus))]、布尼亚病毒科(Bunyaviridae)[汉坦病毒(hantavirus)、克里米亚-刚果出血热病毒(Crimean-CongoHFV)、裂谷热病毒(Rift Valley fever virus)]、丝状病毒科(Filoviridae)[埃博拉病毒(Ebola virus)、马尔堡病毒(Marburg virus)]和黄病毒科(Flaviviridae)[蜱传脑炎复合体病毒(tick-borne encephalitiscomplex viruses)、鄂木斯克出血热病毒(Omsk HFV)、科萨努尔森林病毒(Kyasanur Forest disease virus)](表 15-1)。埃博拉病毒和马尔堡病毒都是苏联开发的生物武器[4]。

(2)传播与疾病:不同出血热病毒引起感染的临床病程也有所不同,多数可以通过血液和(或)体液传播,还有一些可引起人畜共患疾病,也可能发生人与人之间的传播。出血热临床表现也随引起感染的病毒而变化,但患者通常症状有发热、肌痛和全身乏力,随后症状进一步恶化,发展为虚脱、出血、中枢神经系统(CNS)抑制。出现休克、广泛出血和中枢神经系统损害的患者通常预后较差[4]。其他有关出血热病毒的信息见本书第四部分。

7. 鼻疽和类鼻疽(鼻疽伯克霍尔德菌和类鼻疽伯克霍尔德菌)

(1)意义:目前已经公认鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia mallei*)(鼻疽的病原体)和类鼻疽伯克霍尔德菌(类鼻疽的病原体)可作为潜在的生物威胁因子。据说,鼻疽伯克霍尔德菌在第一次世界大战期间,德国特工曾使用鼻疽伯克霍尔德菌用于感染巴尔的摩等盟国港口中马匹、骡子和驴子,希望盟军军事后勤会受到干扰;这些行动成功与否尚不清楚[4]。在第二次世界大战期间,日军也曾应用鼻疽伯克霍尔德菌感染马匹、平民和战俘。20 世纪 40 年代,美国曾将鼻疽伯克霍尔德菌作为一种可能的生物恐怖制剂加以研究,但是没有进行武器化应用[4]。另外有人认为,苏联也曾有兴趣把鼻疽伯克霍尔德菌作为一种潜在的生物恐怖制剂[4]。

(2)传播与疾病:伯克霍尔德菌属为无芽胞、专性需氧型革兰阴性杆菌。孵育 24～48 h 后,类鼻疽伯克霍尔德菌可形成干燥、起皱的菌落,并倾向于具有强烈的泥土味;而在 24～48 h 后,鼻疽伯克霍尔德菌形成小的、灰色、半透明的菌落,不起皱且无异味(图 15-6 和图 15-7)。马、骡和驴是鼻疽伯克霍尔德菌的天然宿主,与感染动物密切接触后,人类会感染鼻疽,但自然传播的风险很低[4]。类鼻疽伯克霍尔德菌则是东南亚和北澳大利亚州的特有菌种,存在于水和土壤中。鼻疽和类鼻疽症状相似,疾病类型包括以下几种形式:局部感染、肺部感染(肺炎、肺部脓肿及胸腔积液)、败血症和慢性型(内脏多发性脓肿)。气溶胶化/肺型的鼻疽和类鼻疽伯克霍尔德菌被认为都是潜在的生物恐怖制剂,原因是该菌可通过空气吸入具有很高的传染性,且对许多常规抗生素耐药[4]。请参阅 ASM 哨点临床微生物学实验室指南中的伯克霍尔德菌属章节(http://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines)。进行鼻疽伯克霍尔德菌和类鼻疽伯克霍尔德菌的相应操作应当采用 BSL-3 预防措施在 BSL-3 或 BSL-2 实验室进行。关于伯克霍尔德菌的其他相关信息见本书第 43 章。

四、非Ⅰ类生物制剂

1. 布鲁菌病(布鲁菌)

(1)意义:历史上布鲁菌已被多个国家研究为潜在的生物威胁因子。在第二次世界大战前后,日本的 731 部队曾研究了将布鲁菌作为一种生物武器[22]。20 世纪 50 年代中期,猪布鲁菌是美国的生物战计划中第一个使用的生物制剂[4,22]。苏联也试验过将布鲁菌作为生物威胁剂。Biopreparat 的前副主任肯·阿里贝克(Ken Alibek)叛逃到美国后,指出苏联曾开发了具有抗药性的布鲁菌菌株并制成了武器[22]。但布鲁菌被认为是不太可能用于生物恐怖袭击的生物制剂,部分原因是布鲁菌病发病率虽高,但死亡率低。布鲁菌因为疾病病程漫长、可能致残,因而仍然是一个威胁。布鲁菌属不是Ⅰ类生物制剂,但有 3 个种被列为两部共管的制剂,包括流产布鲁菌(*B. abortus*)、马耳他布鲁菌(*B. melitensis*)、猪布鲁菌(*B. suis*)(表 15-1)。

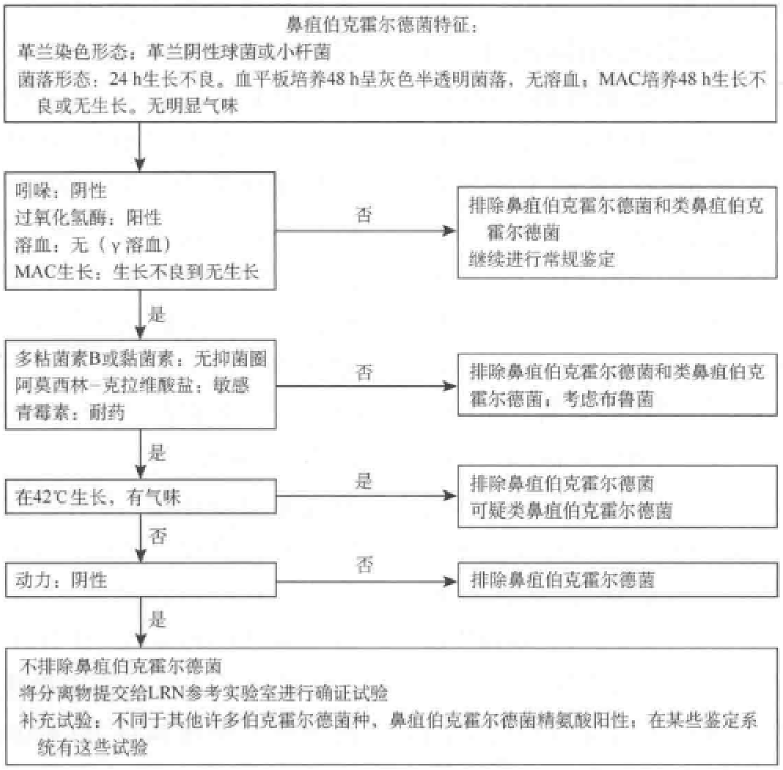


图 15-6　鼻疽伯克霍尔德菌的哨点级实验室流程图。请注意：包括 MALDI-TOF 在内的自动鉴定系统有误判潜在的生物威胁因子的可能。哨点实验室只开展以排除可疑的生物威胁因子的必要的测试。如果遇到不能鉴定的可疑生物威胁剂，应将其提交给最近的 LRN 参考实验室进行确证实验。改编自 ASM 的哨点临床微生物实验室伯克霍尔德菌指南(https://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines)

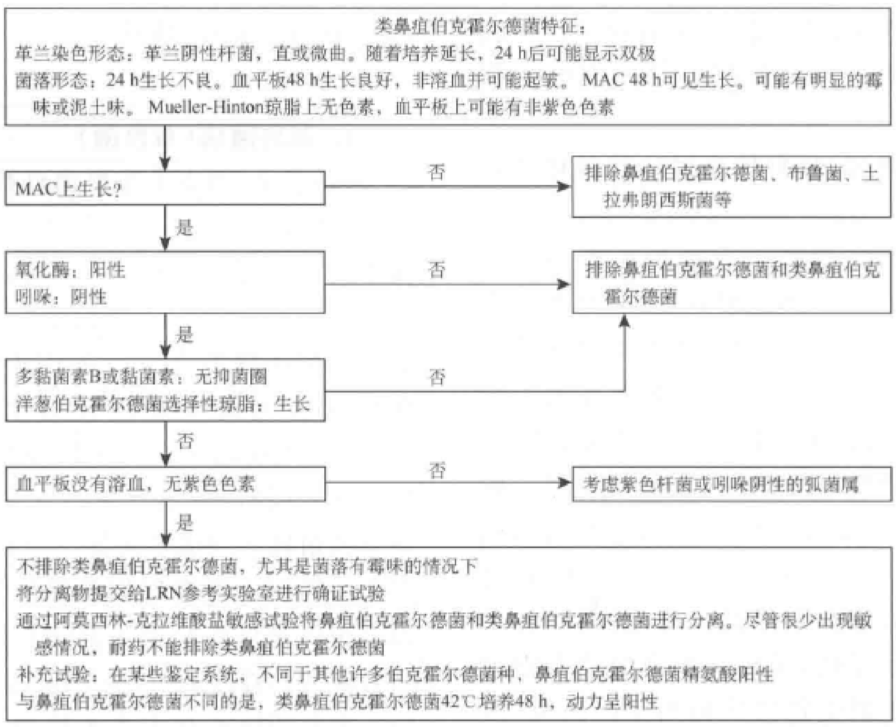


图 15-7　类鼻疽伯克霍尔德菌的哨点级实验室流程图。请注意，包括 MALDI-TOF 在内的自动鉴定系统有误判潜在的生物威胁因子的可能。哨点实验室只开展以排除可疑的生物威胁因子的必要的测试。如果遇到不能鉴定的可疑生物威胁剂，应将其提交给最近的 LRN 参考实验室进行确证实验。改编自 ASM 的哨点临床微生物实验室伯克霍尔德菌指南(https://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines)

(2)传播与疾病：目前有多种公认的布鲁菌种(http://www.bacterio.net/brucella.html)。布鲁菌病是人畜共患的感染性疾病，被公认为能够引起人类感染的菌种有 4 种：牛流产布鲁菌(牛)、马耳他热布鲁菌(山羊、绵羊及骆驼)、猪布鲁菌(猪)及犬布鲁菌(*Brucellacanis*)(犬)。此外，布鲁菌病还是一种常见的实验室获得性感染。布鲁菌是细小的、需氧型革兰阴性球杆菌，生长缓慢(初代分离需要 24～48 h 或更长时间)，氧化酶阳性、触酶阳性、尿素通常也是阳性(图 15-8)。布鲁菌可引起急性和慢性感染。一般症状包括发热、盗汗、头痛、食欲不振、背部疼痛、体重减轻，可以持续数月，中途终止治疗后会复发[4]。布鲁菌病的慢性形式与粟粒性结核类似，肝、脾、骨出现化脓性病变。未治疗人群的布鲁菌病死亡率为 5%[4]。请参阅 ASM 哨点临床微生物学实验室指南中布鲁菌章节(http://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines)。操作布鲁菌培养物时，实验室工作人员有可能通过直接接触而感染。可疑的布鲁菌分离培养应使用 BSL-3 预防措施在 BSL-3 或 BSL-2 实验室进行处理。有关布鲁菌更多相关信息见本书第 47 章。

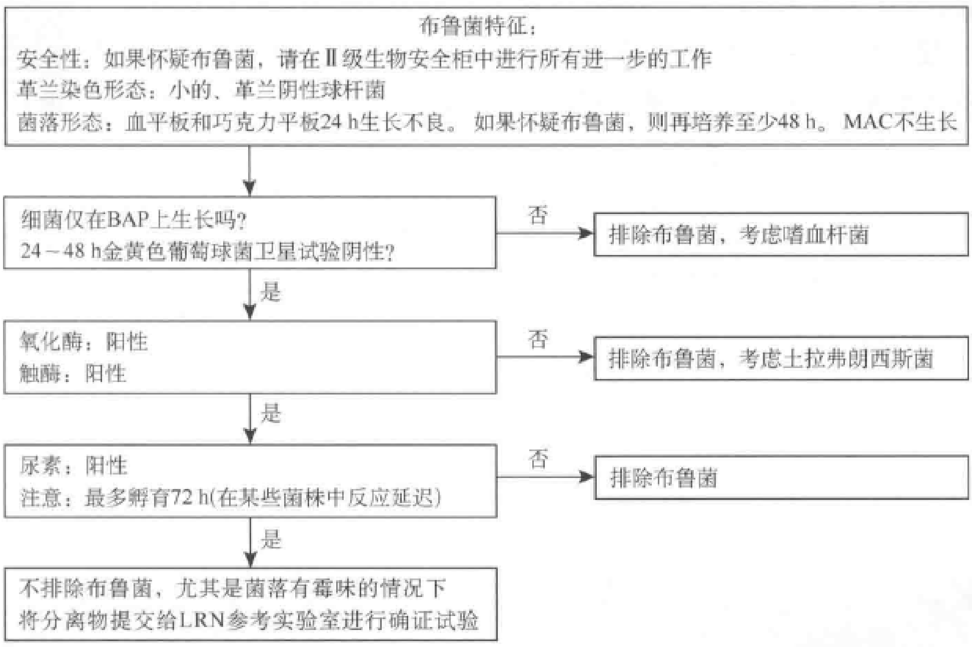


图 15-8 布鲁菌的哨点级实验室流程图。请注意，包括 MALDI-TOF 在内的自动鉴定系统有误判潜在的生物威胁因子的可能。哨点实验室只开展以排除可疑的生物威胁因子的必要的测试。如果遇到不能鉴定的可疑生物威胁剂，应将其提交给最近的 LRN 参考实验室进行确证试验。改编自 ASM 的哨点临床微生物实验室布鲁菌指南(https://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines)

2. Q 热-贝氏柯克斯体

(1)意义：贝氏柯克斯体(*Coxiella burnetii*)具有低感染剂量、耐干燥和耐热的特点。人类对此菌易感，单个微生物就能导致易感者患病。美国于 1955 年在马里兰州的迪特里克堡让志愿者暴露于雾化的贝氏柯克斯体中，以确定人类的感染剂量并确定疫苗效力[3,23]。20 世纪 60 年代，美国军方曾认为柯克斯体是一个极好的"失能"剂，所致疾病可以使人衰弱但很少致命，并设想用来削弱敌军。英国、苏联，甚至还有伊拉克，也曾将贝氏柯克斯体作为生物威胁剂开发并测试过[3,4]，奥姆真理教的信徒也曾研究过将贝氏柯克斯体作为生物武器的用途[3]。贝氏柯克斯体列为卫生与公共服务部管制的制剂，但不是Ⅰ级管制的制剂(表 15-1)。

(2)传播与疾病：贝氏柯克斯体是多形态、革兰阴性的胞内球杆菌，不能在常规细菌培养基上生长。Q 热是人畜共患疾病，主要见于临产的山羊、绵羊和牛。气溶胶污染的尘埃颗粒是人类感染源，且感染剂量非常低。Q 热的死亡率比较低，为 0.5%～1.5%[23]。该感染有 3 种临床表现：非典型性肺炎、渐进性肺炎(快速性)和作为发热和肺炎患者的偶然发现。后者是该疾病最常见形式[4]。Q 热也可表现为慢性感染。请参阅 ASM

哨点临床微生物学实验室指南中 Q 热章节(http://www. asm. org/index. php/guidelines/sentinel-guidelines)。关于 Q 热更多相关信息见本书第 66 章。

3. 葡萄球菌肠毒素

(1)意义:直到 20 世纪 70 年代初,葡萄球菌肠毒素 B(*Staphylococcal enterotoxin* B,SEB)一直被储存和武器化,是美国生物武器计划的一部分[4,16]。SEB 被认为是一种有用的武器,因为它容易制成气溶胶、性能稳定,大剂量吸入时可产生多系统器官衰竭而死亡。即使吸入量少,SEB 也会导致人体虚弱,需要 2 周才能恢复。另外,由于摄入该毒素会引起疾病,SEB 同样被认为是可能的生物武器。苏联可能也尝试过 SEB 武器化[16]。

(2)传播与疾病:SEB 是金黄色葡萄球菌产生的几种肠毒素之一。金黄色葡萄球菌在人类和动物的皮肤和黏膜中普遍存在,系无运动的革兰阳性球菌。SEB 是一种强力的超抗原,能够针对免疫系统产生大量过度刺激,导致强烈的炎症反应和内毒素样休克,进而引起多系统器官衰竭与死亡[4]。请参阅 ASM 哨点临床微生物学实验室指南中葡萄球菌肠毒素相关章节(https://www. asm. org/index. php/guidelines/sentinel-guidelines)。有关 SEB 的其他信息见本书第 21 章。

参考文献请扫二维码查阅

第16章 人类微生物组

JAMES VERSALOVIC, SARAH K. HIGHLANDER,
BHANU P. GANESH, JOSEPH F. PETROSINO
(周宏伟 译;顾兵、倪语星、宁永忠 审校)

人体的细菌总数与人类细胞总数相当[1,2](图16-1)。(译者注:此处关于人体细菌总数的说法与第11版手册中的内容不一致,第12版中根据2016年发表于PLo SBiology上的文献,修正了自1977年以来一直认为的人体细菌总数是人体细胞的10倍,认为人体的细菌总数与人体细胞数目相当。)在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health,NIH)人类微生物组项目(Human Microbiome Project,HMP)的推动下,我们对人体共生微生物的特性和分布有了更深入的了解。特别是二代测序(next-generation sequencing,NGS)技术的使用,有助于阐明这些细菌的特性,以及它们如何受人类健康和疾病的影响。近年来,NGS方法的发展使得微生物组研究在细菌分类和微生物基因鉴定方面取得了重大进展,同时微生物组研究也从肠道扩展到宿主其他部位。随着DNA测序技术的不断发展,对不同的生命阶段、健康和疾病状态,以及所有身体部位的微生物群落[或宏基因组(metagenome)]进行DNA测序变得更加可行。

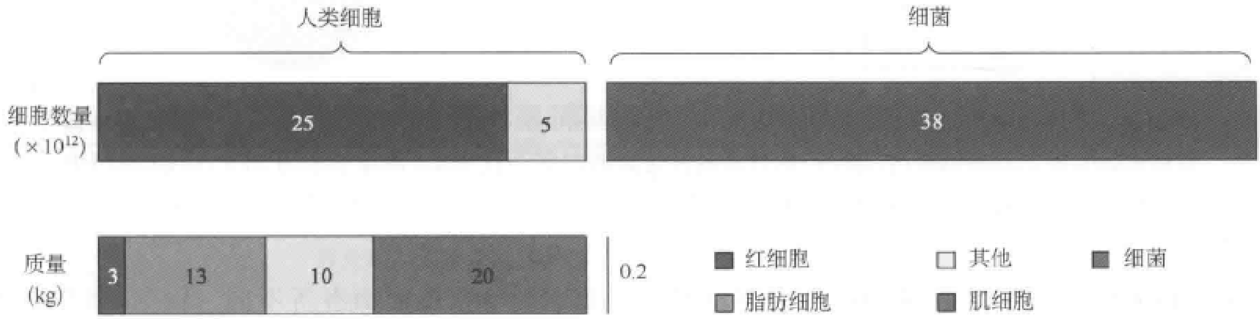


图16-1 人体内不同细胞类型和细菌的相对数量。上面的条形图表示细胞的数量,下面的条形图表示构成整体细胞质量的每种主要细胞类型的贡献[1]。此处该图引用,得到美国公共科学图书馆(Public Library of Science,PLoS)的许可,见彩插

一、人类微生物组研究项目的开端

2007年,NIH启动了一项题为"人类微生物组计划"的医学研究项目(http://nihroadmap.nih.gov/hmp/)。其首要目标是提供工具和资源来帮助鉴定人类微生物组,并将微生物组的组成和功能与人类健康和疾病联系起来。HMP借助核酸测序技术和生物信息学(bioinformatics)技术来实现以下几大目标:①确定个体之间是否共享一个核心的人类微生物组;②了解人类微生物组的变化是否与人类健康和疾病的改变相关;③开发实现这些目标需要的新技术和生物信息学工具;④解决由于人类微生物组研究而引发的伦理、法律和社会问题。

HMP发布了一份完整的临床研究方案,其中概述了2个临床采样中心(贝勒医学院和圣路易斯华盛顿大学)的标准化采样程序[3]和核酸提取

程序。2012年6月起，HMP有了突破性的进展，通过出版两篇指导性文件[5-6]和一系列伴随文件(例如，www.ploscollections.org/hmp)，进一步规范了样品处理、测序和分析的方法[4]，同时还记录了HMP团队对健康队列初步观察的结果，以及从各个角度对多个特征性群体进行的大量研究结果(图16-2)。

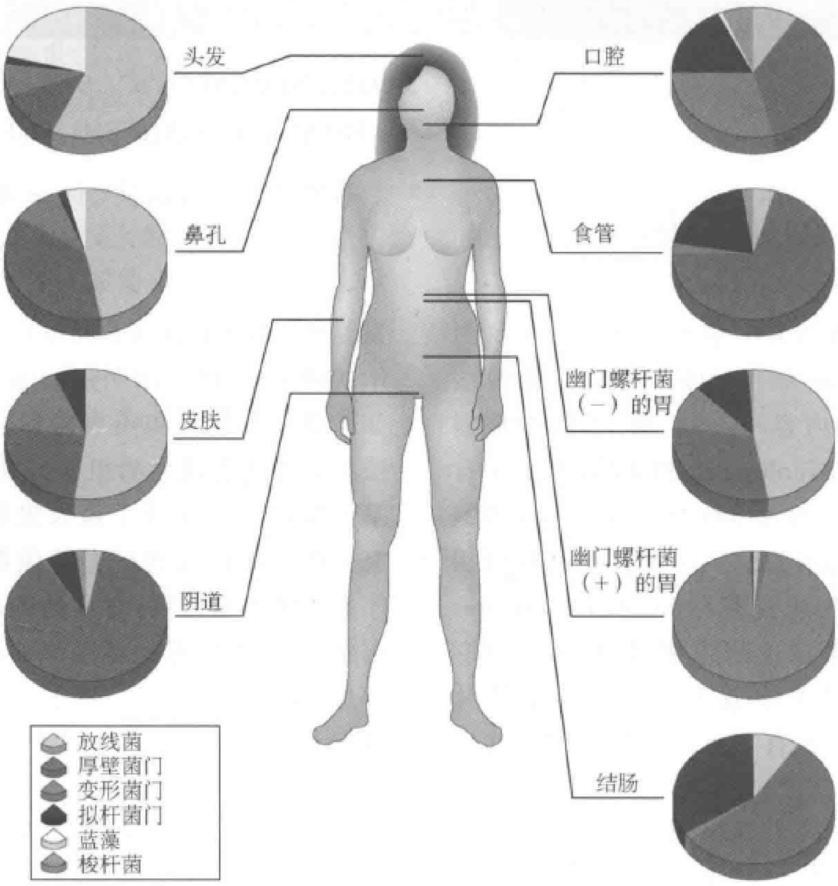


图16-2 不同身体部位的微生物组成(microbial composition)不同。图中显示的是从9个不同身体部位检出的6种不同的细菌门(phyla)相对丰度。这是通过新一代DNA测序技术对16S rRNA基因测序分析得到。此图片改编自参考文献[170]，获得Nature出版集团的许可，见彩插

在最初的微生物组比较中，HMP分析了来自18个身体部位样本的微生物组[7]，证实人体微生物组具有超出预期的高度个体间变异，并确定在这些群落中的稀有微生物是遗传基因多样性[8]的重要贮池。HMP大队列研究数据表明，肠道微生物组的组成通常以关键微生物的平滑丰度梯度为特征[6]，而不一定会将研究对象聚类成离散类型。然而，在某些生态环境如阴道，研究表明其微生物群落组成也可以表现出类似的聚集[4]。虽然个体间微生物群落各不相同，但这些微生物编码的代谢途径及它们与人类共生所必需的代谢途径始终存在相对的一致性，促使微生物组在不同身体部位形成了一个微生物群代谢的功能性“核心”[6,9-10]。虽然这一核心的代谢途径和代谢过程是一致的，但是与这些代谢途径相关的特定基因却有所不同。例如，参与碳水化合物利用的代谢途径在口腔中的体现为单糖代谢途径相关基因的富集，而在肠道内则体现为复杂的碳水化合物代谢途径基因的富集，以及在阴道微生物组中糖原或肽聚糖降解相关的特定基因富集[10]。

人体微生物组研究得到了最新汇编的HMP健康队列数据的有力补充[11]。来自265位成年人的2355个宏基因组结果对不同身体部位微生物组成提出了包括细菌菌株水平变化在内的新见解。研究发现一些细菌种类或只在特定的身体部位富集。同时还发现噬菌体和宿主细菌种类之间的联系，以及人类生态系统中古细菌和细菌种类之间的关系。基于微生物代谢途径的功能分析阐明了生物化学功能的3个层次，包括普

遍的、人类富集的和身体部位富集的亚群。换句话说，微生物的代谢途径可能在身体部位之间共通，也可能只针对人体的某个特定部位。对人类微生物组组成和功能的深入了解，促进了我们对微生物组变异中个体间差异的认识。（译者注：本段内容是第12版新增的内容，介绍了HMP阶段性的数据和成果，于2017年发表于 *Nature* 杂志上。）

二、人类微生物组的研究方法

人类微生物组研究早期依赖培养的方法，然而，目前已知人体内绝大多数微生物都不能够在实验室进行培养。用于检测无法培养的微生物的分子方法依赖于核酸扩增试验，特别是基于PCR来检测细菌高度保守的小亚基16S rRNA基因的技术。自20世纪80年代以来，利用PCR扩增细菌16S rRNA基因片段，并采用末端限制性片段长度多态性（terminal restriction fragment length polymorphism，TRFLP）和变性梯度凝胶电泳（denaturing gradient gel electrophoresis，DGGE）等方法进行分析。自20世纪90年代以来，基于毛细管的16S rRNA基因双脱氧测序已应用于细菌物种鉴定。

最近，二代DNA测序技术已应用于复杂微生物群落细菌基因组中许多16S rRNA靶点的相对高通量测序（例如，Illumina公司的MiSeq或HiSeq平台，San Diego，CA；Thermo Fisher Scientific的Ion Torrent平台，Waltham，MA）。若16S rRNA测序结果中≥97%的基因序列相同，则认为是同一物种（species），而那些≥95%相同的基因序列则认为来自同一个属（genus）。这一框架在解释复杂微生物群落中的微生物组成方面起到了关键作用。

一些依赖细菌培养和不依赖细菌培养的调查显示，分布在人体的细菌有4个主要门类（表16-1）。放线菌门（*Actinobacteria*）、拟杆菌门（*Bacteroidetes*）、厚壁菌门（*Firmicutes*）和变形菌门（*Proteobacteria*）这4个门是当今人类最具代表性的菌门。这4个菌门在人体不同部位占据细菌总DNA序列的92.3%，包括头发、口腔、皮肤、胃肠道[12]。优势菌群因解剖部位不同而异，由此可推测出身体每个部位的宿主环境在塑造微生物群落组成中起着至关重要的作用。最近研究的目标旨在扩大每个门类的DNA序列测定，以便在未来可以进行更全面的系统发育评估[13]。

表16-1 主要菌门在健康人身体各部位中的分布

身体部位	主要的门和类[a]	参考文献
口腔	厚壁菌门[b]、变形菌门[c]、拟杆菌门[d]、放线菌门[e]、梭杆菌门[f]	172，173
食管	厚壁菌门、拟杆菌门、放线菌门	46
胃	变形菌门、厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门、梭杆菌门	60
小肠	厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门	174
结肠（粪便）	拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门、放线菌门	173
泌尿生殖道	厚壁菌门、放线菌门、变形菌门	107，175
上呼吸道	厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门	176
下呼吸道	变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门	177
皮肤、皮脂腺部位	放线菌门、厚壁菌门、变形菌门	144
湿润的皮肤	放线菌门、变形菌门、厚壁菌门	144
干燥的皮肤	变形菌门、放线菌门、厚壁菌门	144

注：[a] 门的列出顺序基于引用的参考文献按照其在每个身体部位所占优势的先后排序；[b] 厚壁菌门包括梭菌属、肠球菌属、乳杆菌属、葡萄球菌属和链球菌属；[c] 变形菌门包括埃希菌属、嗜血杆菌属、螺旋杆菌属（*Helicobacter*）和莫拉菌属；[d] 拟杆菌门包括拟杆菌属、黄杆菌属、卟啉单胞菌属和普雷沃菌属；[e] 放线菌门包括双歧杆菌属、棒杆菌属、表皮细菌属（*Cutibacterium*）和加德纳菌属；[f] 梭杆菌门包括梭杆菌属、纤毛菌属、斯尼思菌属和链杆菌属

三、人类微生物组研究

(一)口腔微生物组

人体每个部位都有其独特的微生物组图谱(图 16-2),口腔包括了一些微生物多样性丰富的生态位,如唾液、牙龈缝隙、舌头表面和后咽,这些部位被数以百计的细菌物种所定植。人类的口腔内有超过 1000 种细菌[8,14-15]。HMP 计划对包括牙菌斑和唾液在内的口腔中 9 个不同的部位进行全方位的采样分析[5-6]。就人类个体各个生态位的微生物多样性[α 多样性(α diversity)]而言,人类口腔微生物组多样性不低于肠道微生物组(intestinal microbiome)的多样性,也不低于 HMP 计划采样的所有其他部位的微生物多样性[5]。HMP 已测出大多数成年人口腔内存有约 70 种不同的细菌属[5],最丰富的口腔细菌属包括放线菌属(*Actinomyces*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、普雷沃菌属(*Prevotella*)、链球菌属(*Streptococcus*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)、纤毛菌属(*Leptotrichia*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)、韦荣球菌属(*Veillonella*)、罗氏菌属(*Rothia*)、二氧化碳嗜纤维菌属(*Capnocytophaga*)、月形单胞菌属(*Selenomonas*)、密螺旋体属(*Treponema*)、糖化菌门暂定门(*Candidatus Saccharibacteria*,也叫 TM7)。人类的口腔微生物可能是口腔环境中特有的。最近的研究表明,副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)的口腔特异性分支仅存在于口腔微生物群中[11]。此外,属于古菌域(Archaea domain)的甲烷短杆菌类群(*Methanobrevibacter taxa*)也存在于人类的口腔中。口腔内不同部位也有不同程度的生物多样性,其中牙菌斑和唾液标本具有最大的相对多样性[8]。

口腔微生物组研究中应用了 16S rRNA 基因测序技术以及其他方法,包括变性梯度凝胶电泳(DGGE)[16-18]、末端限制性片段长度多态性(TR-FLP)分析[19]及棋盘式 DNA-DNA 杂交法,后者可以用 30～40 个 DNA 探针对 45 个 DNA 样本同时进行检测[20]。Haffajee 和 Socransky 及其同事应用棋盘式 DNA-DNA 分子杂交技术对牙龈上[21]和牙龈下[22]斑块中微生物群落进行了分析,同时还研究了健康人和牙周炎患者牙齿生物膜形成过程中微生物动态谱(变迁)[23-24]。在这两项研究中,通过主成分和对应分析确定了牙龈独特的复合体组成,以牙龈上和牙龈下斑块的细菌属相对丰度为研究对象,在微米尺度上探讨了人类口腔微生物组的生物地理学(biogeography)特征[25]。在人类口腔中,多种菌群形成微生物群落,包括牙齿和牙龈表面的生物膜。利用分子探针和光谱成像荧光原位杂交相结合的方法,在牙菌斑(如刺猬状和花椰菜状)中发现了微米级的生物地理学特征的群落[25](图 16-3)。例如,刺猬结构状牙菌斑菌群组成包括丝状细菌(专性厌氧菌和兼性厌氧菌),如棒杆菌属(*Corynebacterium*)、纤毛菌属(*Leptotrichia*)和在相对缺氧条件下的基部和核心处的梭杆菌属(*Fusobacterium*)。链球菌属(*Streptococcus*)等需氧球菌和嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、凝聚杆菌属(*Aggregatibacter*)等需氧杆菌分布于周围相对富氧区。而花椰菜结构的牙菌斑中含有聚集体,中心为劳特罗普雷菌属(*Lautropia*),外围为韦荣球菌属(*Veillonella*)、嗜血杆菌属(*Haemophilus*)、凝聚杆菌属和链球菌属。已知的口腔致病菌,如梭杆菌属和凝聚杆菌属,可能倾向于在不同结构和不同细菌邻居的环境中引起感染。加强对口腔微生物群共有结构的了解,将有助于进一步认识微生物对口腔健康和口腔病理学的贡献。(译者注:本部分关于牙菌斑的微生物群落研究结果解读是本版本新增内容。)

与 HMP 一样,其他研究也检测了口腔不同部位微生物的定植与演替。Aas 等的研究[26]检测了口腔中 9 个采样点:舌尖、舌背、舌侧颊上皮、硬腭、软腭、龈缘上、龈缘下、上颌前牙和扁桃体样本。对 5 位受试者的 2589 个 16S rRNA 基因克隆进行分析;测序结果显示存在 141 个优势种和 13 种新的表型。所有采样位置均测出了孪生球菌属(*Gemella*)、颗粒链球菌属(*Grannulicatella*)、链球菌属、韦荣球菌属。其中扁桃体含有最高的微生物多样性,这种多样性在人与人之间有明显不同。每个健康的个体中都发现有与细菌性心内膜炎有关的微生物,如缓症链球菌(*Streptococcus mitis*)、口腔链球菌(*Streptococcus oralis*)[27]、毗邻颗粒链球菌(*Granulicatella adiacens*)[28],此结果支持以下观念:这些口腔微生物有可能在进行牙科操作时通过血流移位播散至心脏瓣膜,从而引起继发的心内膜炎感染。HMP提出的一个核心

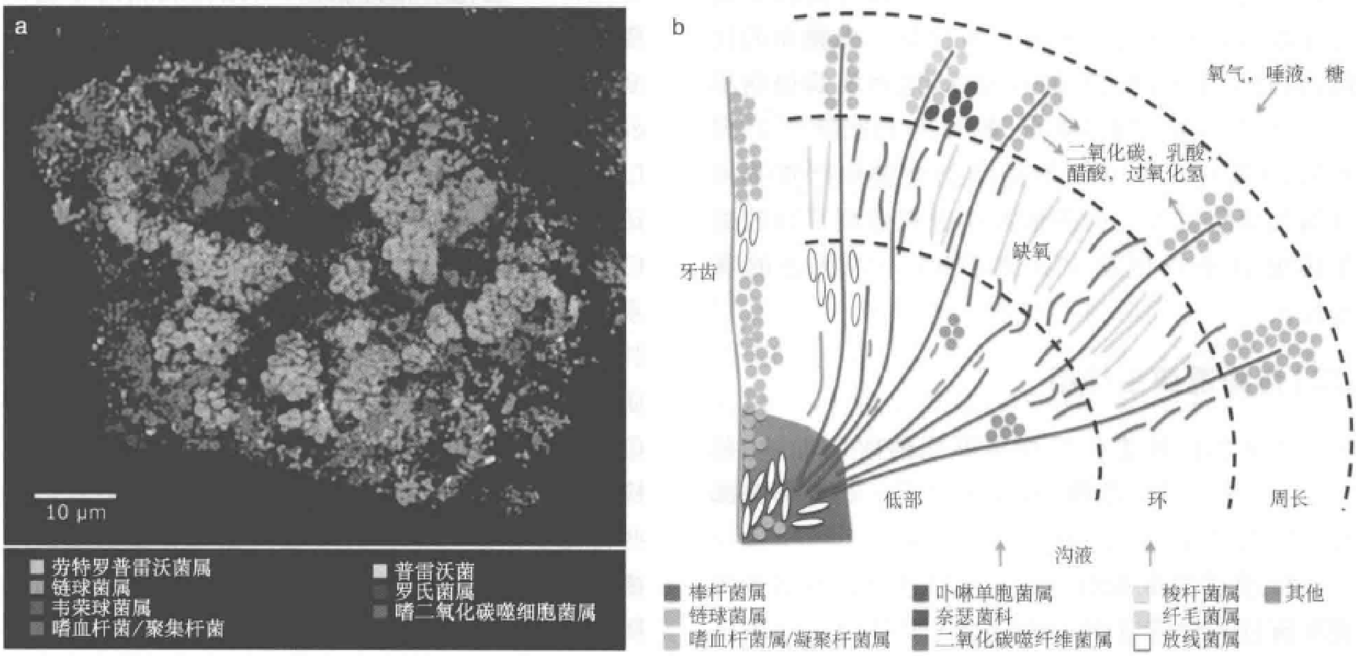


图16-3 人类口腔微生物组的生物地理分布和结构(biogeography and structures)

a. 牙菌斑中的花椰菜结构，主要由劳特罗普雷沃菌属、链球菌属、嗜血杆菌属/凝聚杆菌属和韦荣球菌属组成；b. 解释刺猬结构的简要假设，棒杆菌丝与含有链球菌和放线菌的生物膜结合[25]。此图片引用已获得《美国国家科学院院刊》(*Proceedings of the National Academy of Sciences*)的许可，见彩插

观念是：条件致病菌比典型病原体更普遍存在，在某些个体中它们可同时存在于身体的多个部位[5]。黏膜完整性或免疫功能受损的个体可能更容易受到人类微生物组中条件致病病原体的侵袭。

人类口腔微生物识别芯片(Human Oral Microbe Identification Microarray)(http://homings.forsyth.org/index2.html)采用16S rRNA基因寡核苷酸探针，可检测前述约700种口腔细菌物种[29]。虽然微生物数量在不同的人群中存在差异，例如患病者口腔微生物组中含有更多的牙周病原体，但研究得出的主要结论是：微生物多样性的增加与下牙龈疾病有关。唾液中微生物组也有相关的研究[30-31]：对来自12个地区的120名健康受试者样本16S RNA的V4-V6区域基因进行Sanger测序法分析，得到14 115个序列，共鉴定出101个菌属，每个受试者细菌菌属的数量为6～30个。最常见的属是链球菌属(23.7%)，这与健康个体食管和胃(上消化道)的优势链球菌情况相一致。

这些开创性的研究给我们提供了新的观念，包括身体不同部位之间生物多样性的差异。相比人类皮肤，人类口腔中的几个部位在个体内的微生物物种丰富，但β多样性(beta diversity)较低，或个体间的口腔微生物群落更相似[5-6]。与健康相关的微生物群落可预防感染，但部分口腔微生物也与局部和全身疾病有关，包括牙周病[32]、心内膜炎[33]、高血压[34]、头颈部恶性肿瘤[35]及吸入性肺炎[36]。健康或疾病相关微生物的相对优势与个体遗传易感性相结合，最终可能导致不同的疾病表型。

牙周炎是一种感染性炎症性疾病，它与成人牙源微生物组中微生物生态学紊乱相关。Socransky等提出，牙周炎是病原体复合物或联合作用的结果[22]。这所谓的红色复合物(red complex)，牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*)和齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)，它们是与牙周炎产生过程最密切相关的致病群[22,37]。伴放线凝聚杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)，这种细菌病原体是一种革兰阴性杆菌，在非洲人群中与具有强烈嗜宿主性的高度侵袭性牙周炎(地域侵袭性的牙周炎)有关[38]。基于全基因组鸟枪法测序研究证明，未培养的TM7菌与牙周炎有关，

但该菌与疾病的关系还需进一步以人群为基础的研究进行充分评估。牙周炎不仅是一个独立的疾病，同时也是不同疾病的并发症，这些疾病包括早产、心血管疾病、肺部疾病、糖尿病和肥胖[38]。据报道，患有进行性牙周炎的孕妇会增加严重不良妊娠的风险[39-40]。这些相关性研究强调了口腔微生物组对全身健康状况和疾病易感状态的重要性。

(二)胃肠道微生物组

人类的胃肠道包括许多不同的解剖部位，包括食管、胃、小肠、结肠、直肠和肛门。每个部位都有不同数量和结构的菌群。

1. 食管微生物组 微生物通过口腔吞咽或者胃反流进入食管定植。早期的研究集中于细菌培养[41-45]，研究的细菌数量有限，在健康人体中以革兰阳性需氧菌与厌氧菌定植为主。食管微生物仅有3个宏基因组的报道。Pei等的研究[46]发现，除食管中没有发现螺旋体外，4名成年人食管远端的微生物组成与口咽部相似；链球菌属也是健康人食管微生物组的优势菌属[47]。通过细菌DNA序列可以分为以下6种门或组：厚壁菌门(70%)、拟杆菌门(20%)、放线菌门(4%)、变形菌门(2%)、梭杆菌门(2%)及TM7(1%)。这种分布与厚壁菌门和拟杆菌门在胃肠道的相对优势是一致的。Chao等[48]分析测试出在食管中大约有140个可操作分类单元(operational taxonomic units，OTUs)，并发现了36个新的物种。比较食管炎以及Barrett食管(肠化生)的微生物组成，发现两者微生物组存在差异[49-50]。在健康人及以疾病患者食管中发现两种截然不同的微生物组，健康个体的食管微生物组主要由链球菌组成，而患病个体的微生物组有大量的革兰阴性厌氧菌和更多的细菌多样性[50]。在前期的食管癌患者中也发现了类似的细菌组成变化[43]。

2. 胃微生物组 胃内低pH环境和胃的快速蠕动抑制了许多细菌的定植。胃和小肠中微生物含量大约为100个/ml，但是餐后微生物的数量可增加到10^5个/ml[51]。幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)是研究最深入、临床上最重要的胃内微生物[52]。当幽门螺旋杆菌存在时，其相对丰度远远超过其他胃微生物[53]，控制着胃的生态系统。与幽门螺旋杆菌感染相关的胃病表型进展，包括慢性胃炎、肠化生和胃腺癌，与细菌属相对丰度的变化有关[53]。例如，肠化生、异型增生和胃腺癌与变形菌门中的埃希-志贺菌属(*Proteobacteria* genera *Escherichia-Shigella*)和伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)的相对数量增加有关。虽然对胃活检标本进行微生物宏基因组检查与分析的方法已经发现了比培养方法更多的微生物物种(128种系统发育型)[54]，但是依靠培养的方法也揭示了有其他的菌属，如乳杆菌属(*Lactobacillus*)、链球菌属、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)及肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)的一些成员[6]。除了幽门螺杆菌以外，胃微生物组中最常见的菌属还包括一些常见于口腔和食管的菌属。在人类胃中发现的菌属包括普雷沃菌属、链球菌属、韦荣球菌属和罗斯伯里菌属。其他的研究已经报道了胃微生物群中乳杆菌属、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)和链球菌属的相对丰度[47]。在幽门螺杆菌不存在时，链球菌属是胃内的主要菌属[55]。

3. 小肠微生物组 就像胃一样，近端小肠(十二指肠和空肠)定植的微生物物种数量有限。小肠近端至中端内的酸性pH及胆汁抑制了细菌的定植。小肠中细菌群落通常由乳杆菌、肠球菌、革兰阳性需氧菌和兼性厌氧菌组成，而链球菌属似乎是十二指肠和空肠的优势菌属[2,56-57]。这段胃肠道主要通过培养的方法进行评估，分子检测的数据相当缺少。小肠微生物组的变化与慢性疾病状态有关。例如，十二指肠微生物组与乳糜泻的发病有关。在活动性乳糜泻中，拟杆菌属、梭菌属和葡萄球菌属的相对丰度升高[47]。一项基于定量PCR的研究显示，回肠造口术样本与完整的小肠组织的微生物组成存在差异[58]。回肠微生物组成相对复杂，从物种丰富度和优势细菌属的性质来看更接近于结肠。

4. 结肠微生物组 人类结肠中含有丰富的微生物群落，其数量估计为10^{11}～10^{12}细菌量/g，每个个体的细菌种类超过100种[6,8]，其中大多数属于拟杆菌门和厚壁菌门[5,59-60]。肠道内其他代表性门类包括放线菌门、变形菌门和疣微菌门(*Verrucomicrobia*)。在不同胃肠道疾病的患者中，变形杆菌相对丰度增加[61]。通过对健康成年人自己收集的粪便标本进行综合评价，发现人类肠道中物种丰富度和微生物多样性都高于身体的其他部位[5,6]。结肠的特点是有一长串罕见、未知的细菌

类群，占胃肠道内大多数的物种或分类单元[8]。基于全基因组鸟枪法测序[6,62]得出健康人肠道微生物组包含70～100个已知的细菌类群。就已知的肠道细菌而言，粪便中相对丰富的主要菌属是拟杆菌属。其中相对丰富的一个标志性物种是拟杆菌门中的另一种称为粪便普雷沃菌（*Prevotella copri*）[5]的细菌，这些标志性物种在身体不同部位构成也不同。有趣的是，拟杆菌属下不同种类是肠道菌群中个体间变异的主要来源，而厚壁菌门的细菌在个体内的时间动态性更强[11]。肠道微生物在肠道内的分布也取决于这些菌群所在的黏膜与肠腔位置[60]。黏膜相关的微生物组构成，不同于粪便标本中的微生物组的构成。

来自远端肠道的细菌对宿主营养起着至关重要的作用，也可能在人体健康和疾病中发挥关键作用。微生物衍生的碳水化合物发酵产物如短链脂肪酸（short-chain fatty acids，SCFAs）（如丁酸盐、乙酸盐、丙酸盐）能够提供10%或更多的身体的代谢需求。丁酸盐是结肠上皮细胞的主要能量来源，由梭菌的Ⅳ群和ⅩⅣa群产生，这种SCFAs还可能具有抗癌特性[63-65]。SCFAs可能在预防肠沙门菌鼠伤寒血清型（*Salmonella enterica serovar Typhimurium*）[66]和肠出血型大肠埃希菌（*enterohemorrhagic Escherichia coli*，EHEC）O157:H7[67]等病原体的感染方面发挥作用。单批发酵系统（single-batch fermentation systems）可用于模拟人类结肠微生物群落对饮食变化的反应。补充几种益生元（prebiotic）、低聚糖（oligosaccharides）可增加双歧杆菌（*Bifidobacterium*）的丰度，同时结肠微生物组产生的醋酸盐也会增加[68]。在功能上，多糖代谢[特别是甘露聚糖降解（mannan degradation）]是人类肠道微生物组的一个分化特征[11]。

已有报道，肠道微生物分为3个基本的肠道菌群类型，即肠型（enterotype），它们在细菌组成和功能上有明显的不同[69]。肠道菌群1型、2型和3型分别富集不同的属，如拟杆菌属、普雷沃菌属、瘤胃球菌属（*Ruminococcus*）。这些相同的肠型在不同的特异性代谢途径上有不同的富集，如生物素、维生素 B_1 等生物合成途径[69]，同时这些微生物组的遗传图谱突出了维生素和代谢产物的差异。这种分类系统在研究人群及其对疾病易感性的基本差异中可能是一个有用的架构。例如生物合成能力的差异，包括维生素的新陈代谢，可能对人体健康产生营养方面的影响。然而，在健康人群中，肠型的概念已经受到其他概念的挑战，如持续变异论[70]和肠道梯度论（enterogradients）[71]。肠道微生物群的功能变异通常与属于变形菌门的细菌分类单元的改变有关[72]，然而变形菌门在以肠型为基础的分类中并不占显著地位，这对肠型模型的完整性提出了更多的问题。肠道微生物群落可能由于饮食改变而发生快速的变化[73]，但是尽管进行了为期10 d的膳食干预，肠道菌型仍然保持相对稳定[74]。对2个不同个体的粪便样本获得的WGS测序数据进行深度分析[75]，预测了超过50 000个的可读框并且用直系同源基因簇（clusters of orthologous groups，COG）和京都基因和基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）软件检测到大量的代谢途径。分析揭示了这些代谢途径与降解植物多糖体所需的酶、SCFAs产物、维生素合成、甲烷生成以及有毒的植物酚醛产物的降解相关。结肠细菌进一步通过合成氨基酸[76]和维生素（如K、B_{12}、生物素、叶酸和泛酸）[77-78]来提供营养。这些结果与其他类似的研究都强调了肠道微生物组的代谢能力。

肠道微生物组似乎对人体发育和代谢具有根本的影响。从菌群的变化来看，新生儿期和婴儿期是一个剧烈波动和动荡的时期[79]。双歧杆菌和双歧噬菌体（bifidophages）在母婴对中的垂直传播已被证实，这些研究进一步支持了人类肠道通过母乳微生物组定植的观点[80]。在婴儿期之后，肠道微生物组在人类生命的前2～3年里继续迅速转移和改变，然后进入一个相对稳定的时期[81]。在青春期前的儿童时期，肠道微生物组的组成和功能分化持续进行，阿克曼菌（*Akkermansia*）和双歧杆菌等细菌属相对丰富，氨基酸代谢和维生素生物合成途径相对丰富[82]。对早产儿的微生物动态谱进行了深入研究，结果表明，杆菌相对减少，梭状芽胞杆菌和γ-变形杆菌数量增加[83]。多重耐药的肠道致病菌常出现在新生儿肠道菌群中，可导致继发性肠道感染或脓毒症[84]。丹麦一项对330名婴儿进行的为期3年的研究表明，在9～18个月之间，随着固体食品的引入，婴儿肠道细菌的丰度发生了巨大的变化。特别是拟杆菌属增加，双歧杆菌属、乳杆菌属（*Lactobacillus* spp.）和肠

杆菌属减少。此外，厚壁菌门内的各种物种相对丰度增加。如柔嫩梭菌(*Clostridium leptum*)、霍尔真杆菌(*Eubacterium hallii*)、罗斯伯里菌属(*Roseburia*)等产丁酸的菌的相对丰度增加[85]。研究人员将基因作为人类健康的生物标志物，检查整个肠道微生物组或微生物大量基因中各种基因的相对数量。使用这种方法，每个人将被定为或是高基因数(high-gene-count，HGC)者或是低基因数(low-gene-count，LGC)者，这些基因数量似乎影响着人体健康状况和疾病易感性。LGC者和HGC者个人平均细菌和噬菌体基因数量分别为380 000和640 000[86]。HGC者被认为拥有更强大的微生物代谢功能、一个相对强劲肠道微生物组和较好的整体健康状况，包括较低发病率的肥胖流行率和代谢紊乱[86]。

宏基因组学研究旨在了解微生物在炎症性肠病(inflammatory bowel disease，IBD)和2型糖尿病等慢性免疫介导性疾病中的作用。炎症性肠病发病机制可能是多因素的，包括宿主遗传因素、免疫反应、环境因素和肠道细菌[87]。克罗恩病(Crohn's disease)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)与粪便中的微生物多样性减少有关。一项基于PCR技术的研究表明，IBD活检样本中已没有厚壁菌门和拟杆菌门的共生细菌[88]。特别是梭菌属的成员相对数量减少，包括梭菌属菌ⅩⅣa群中的许多菌，其中包含产丁酸盐的微生物。随后的研究发现，IBD患者缺少普拉梭菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)[88-91](译者注：*Faecalibacterium prausnitzii* 是定植于哺乳动物胃肠道的共生菌，是人体肠道内数量最多的具有益生特性的细菌之一。也有将其译成柔嫩梭菌、普拉栖粪杆菌)。除了对微生物组成的研究外，IBD患者中还发现了代谢途径相对丰度的差异[92]。炎症性肠病患者微生物中氧化应激代谢途径相对富集，而健康受试者中则是与碳水化合物代谢和氨基酸生物合成有关的几个微生物代谢途径富集。IBD基因型(如与免疫激活相关的NOD2状态)和表型与肠道微生物组特定成分的改变有关[93]。对IBD和结直肠癌等疾病的外科干预可能会由于氧暴露、组织缺血再灌注、口服和静脉注射抗生素以及通便清洁技术的改变而剧烈地改变肠道微生物的组成和功能[94]。2型糖尿病是一种具有自身免疫和代谢成分的慢性疾病。宏基因组相关研究(Metagenome-wide association studies，MGWAS)已经确定了与2型糖尿病相关的基因标记[62]。胰岛素抵抗是2型糖尿病的前兆，它与支链氨基酸浓度的增加和肠道微生物组中支链氨基酸生物合成潜力的增加有关[95]。这些研究强烈表明，肠道中的微生物群可能有助激活疾病(如糖尿病)进展所需信号通路。

(三)阴道和胎盘微生物组

阴道菌群在预防生殖道和尿道感染方面起着重要的作用。阴道菌群的组成随年龄、pH值和激素水平[96]而变化，在月经周期[97]和妊娠期间[98]发生动态变化。乳杆菌是在健康绝经前妇女阴道内最普遍存在的微生物，并可能通过抑制病原体的定植来保护机体。这种保护作用可能是通过乳杆菌的黏液覆盖、有机酸产生，从而使阴道pH降低，及产生抗微生物成分，防止病原体增殖[99]。除了乳杆菌，在临床微生物学实验室培养出的主要阴道微生物还有动弯杆菌属(*Mobiluncus* spp.)、阴道加德纳菌(*Gardnerella vaginalis*)、拟杆菌属(*Bacteroides* spp.)、普雷沃菌属(*Prevotella* spp.)和人型支原体(*Mycoplasma hominis*)[100]。

微生物群落分析研究表明，阴道菌群是高度可变的，其微生物组成的波动除了宿主遗传因素外，可能还取决于性行为和卫生习惯的差异。在HMP中，对阴道内3个部位进行了研究，并记录这些部位之间的差异[5]。在不同个体之间，阴道的微生物多样性是相对有限的。乳杆菌属是大多数人阴道菌群的主要成员，但在少数人未检出。在一项研究中，检测了220例患有和不患有细菌性阴道病(bacterial vaginosis，BV)的女性，在非BV者，卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)和惰性乳杆菌(*Lactobacillus iners*)主导着阴道细菌群落[101]。在患有BV的女性中，羊膜纤毛菌属(*Leptrotrichia amnionii*)和埃格特菌属(*Eggerthella* spp.)是与BV相关的物种，符合Amsel对BV的4个标准[101]。一些研究表明阴道微生物群的改变与病毒共感染风险的增加有关[102-104]。相反，阴道微生物组，特别是丰富的乳杆菌属，对女性使用杀菌策略预防艾滋病毒感染的能力产生重大影响[105]。

研究表明，健康白种人女性的阴道微生物菌群组成各不相同[106]。5例女性菌种数量和菌种系

的分布都不同。2例女性完全或几乎完全是卷曲纤毛菌(*Leptotrichia crispatus*),第3位主要的物种为惰性纤毛菌(*Leptotrichia iners*),第4例主要为阴道阿托波菌(*Atopobium vaginae*)定植,第5例有7个菌种,主要是惰性纤毛菌,而且还有较大量的阴道阿托波菌(A. vaginae)、巨球菌属(*Megasphaera*)及纤毛菌属(*Leptotrichia*)。像乳杆菌一样,纤毛菌属和阿托波菌属(*Atopobium*)都产乳酸。这些数据表明,不同的微生物群落可能具有共同的功能。一个纳入了396例无症状北美女性的相对较大的研究根据阴道微生物组成不同归纳为5个型别[107]。其中4个型别均以不同的乳杆菌为主,而第5种型别包含较大比例的严格厌氧菌。在此研究中包含了4个不同种族,不同种族间微生物组菌群的比例各不相同,并强调了宿主的基因型/表型与阴道微生物组的组成之间的相互关系[107]。阴道微生物组的组成可能因种族和民族而有显著差异。在一项针对不同城市人群的独立研究中,成年女性阴道微生物组产生了3种基本类型[108]。其中2种类型包含以乳杆菌(卷曲纤毛菌或惰性纤毛菌)为主,但有一种类型(主要存在于非洲裔女性中)不以阴道乳杆菌为主,而是包含阴道加德纳菌的多菌群。微生物群落中的这种差异可能与不同疾病的易感性有关。

最近的几项研究证实了人类子宫内存在胎盘微生物组。对320例女性的胎盘样本进行的综合评估证实了人类胎盘内存在微生物群落[109]。在人胎盘标本中鉴定了拟杆菌门、厚壁菌门、梭杆菌门、变形菌门及软壁菌门(*Tenericutes*)等几个门的细菌类群。胎盘生态系统以丰富的变形杆菌和相对独特的软壁菌[包括宫内支原体属(*Mycoplasma*)和脲原体属(*Ureaplasma*)]而著称。在微生物组成方面,胎盘微生物组与口腔微生物组最为相似,这增加了在妊娠期间共生微生物通过血液从口腔传播到胎盘的可能性。早产的胎盘标本富集伯克霍尔德属。一项随访研究描述了妊娠期过度增重相关的胎盘微生物组分和功能的差异[110]。在妊娠期体重增加过多的胎盘标本中,参与叶酸和丁酸代谢的微生物途径减少。胎盘微生物组的特殊特征与绒毛膜羊膜炎(chorioamnionitis)的严重程度和不良的出生结局有关[111]。一项评估15对母婴的研究还发现,在胎盘、羊水、初乳和新生儿肠道中发现的细菌类群有着惊人的相似性[112]。这项研究还发现,变形菌门细菌在人胎盘中相对丰富。初乳中微生物的存在,以及出生时肠道微生物的发现,证实了胎盘微生物组的存在和子宫内微生物代谢物的生成。分娩方式似乎不影响出生后最初几周内人类微生物群的纵向发育,每个身体部位都有一个差异的微生物群,可通过婴儿早期的生物地理学特征加以区分[113]。

(四)呼吸道微生物组

呼吸道作为一个生态系统可以分为上呼吸道和下呼吸道。上呼吸道的研究主要集中在鼻孔和鼻咽部。健康的鼻孔和鼻咽部含有链球菌(*Streptococci*)、葡萄球菌(*Staphylococci*)、棒杆菌(*Corynebacteria*)、莫拉菌属(*Moraxella* spp.)、奈瑟菌属(*Neisseria* spp.)[包括脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)和嗜血杆菌属(*Haemophilus* spp.)][114]。HMP表明在健康成年人的前鼻腔相对优势的有棒杆菌属、莫拉菌属、丙酸杆菌属和葡萄球菌属[6]。潜在的病原菌定植于鼻腔和鼻咽部。研究发现,儿童鼻咽部存在与内耳感染相关的微生物[如肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)和卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)][115]。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)携带率约为30%,分离菌株中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant S. aureus,MRSA)约占1.5%[116]。人类微生物组研究显示,金黄色葡萄球菌是前鼻腔的优势菌株[6],这说明金黄色葡萄球菌是人类宿主的潜在病原体之一,潜在和机会性病原体经常存在于黏膜表面,包括鼻咽和气道。

下呼吸道包括气管、支气管和在肺内延伸到肺泡或气囊的细支气管,新生儿呼吸道在第1天就发现了人类呼吸道群落的证据,进一步支持了在胎儿发育过程中黏膜表面定植的观点[117]。呼吸道微生物组成的变化与呼吸道不同的疾病状态有关:肺结核患者的气道微生物多样性高于健康对照组[118],还有研究提出了以7种细菌为核心的囊性纤维化微生物组[119]。将囊性纤维化患者肺内微生物群落与其相应的咽和痰标本进行直接比较,发现肺内经常含有同源的微生物病原体,这些

结果可能与从咽或痰标本培养出异源性的结果有很大的不同[120]。呼吸机相关性肺炎与单一微生物类群或优势病原体有关，这个发现与其他研究结果相一致，这些研究显示通常单一病原体在下呼吸道感染中占主导地位[121]。上呼吸道标本在疾病状态下的微生物多样性急剧增高，尤其是较深气道的感染时。气道微生物组可能影响进展性肺疾病的易感性。在继发性肺支气管发育不良的婴儿中，气道微生物出现多样性降低以及特征微生物的富集[122]。链球菌属和葡萄球菌属与哮喘疾病特征相关，可促进急性发作[123]。除了哮喘患者支气管微生物组成的差异外，还发现气道微生物组的功能差异，包括氨基酸和短链脂肪酸代谢的差异[124]。支气管微生物群的组成和功能特征也与类固醇反应性的差异有关。气道微生物组学可能影响慢性呼吸系统疾病患者的诊断和治疗。除了疾病状态，环境因素如通风和抗菌药物的使用可能会改变人体呼吸道的微生物群。在重症监护室，呼吸机的使用与气道微生物多样性的降低有关，与抗生素的使用无关[125]。身体不同部位的微生物之间的相互作用可能影响特定的疾病状态。例如，呼吸道和肠道微生物群的相互作用可能调节儿童慢性哮喘和过敏性疾病的进展[126]。

(五)皮肤微生物组

皮肤是人体最大的器官，其表面积估计有25 m^2[127]。皮肤包括表皮、毛囊和汗腺，并且它们都被微生物定植[127]。皮肤具有屏障功能，其低pH可防止许多病原体定植。同时，最重要的是，定植在皮肤上的健康微生物(皮肤微生物组)通过进一步降低局部pH及与先天免疫系统的相互作用，为抵抗感染提供了第一道防线[128]。通过微生物信号上调表达宿主编码的抗菌肽(antimicrobial peptides,AMPs)是其中重要途径[129]。一些皮肤共生细菌，尤其是表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)和其他凝固酶阴性葡萄球菌(coagulase-negative *staphylococci*)，产生抗金黄色葡萄球菌和化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)[130-131]等病原体活性的抗菌肽，如抗生素和酚溶性调节蛋白。表皮葡萄球菌脂磷壁酸也可以通过Toll样受体2信号通路[132]抑制皮肤损伤后的炎症反应。

新生儿出生数分钟后，从母亲那里获得的低多样性微生物群[133]，无菌的皮肤作为栖息地就开始出现细菌定植。随着皮肤不同部位的湿度、温度和腺体的特点不同，环境中微生物群定植于不同的皮肤部位，产生了具有高多样性的皮肤微生物组[134](图16-4)。随着儿童进入青春期和成年期，这些与皮肤相关的微生物群落根据性别和接触的环境继续变化[135-140]。在健康成人中，皮肤微生物组甚至保持在菌株水平[141]的稳定，但仍存在个体差异。

成年人皮肤菌群的16S rRNA基因测序结果表明，绝大部分皮肤共生菌群可纳入4个主要门类：放线菌门、厚壁菌门、拟杆菌门及变形菌门，其中以放线菌门为主[138,142-143](表16-1)。对20多个不同皮肤部位的调查显示，基于皮肤生理学存在不同的微生物群落结构(图16-4)[144]。例如，表皮细菌种类，包括痤疮表皮细菌(*Cutibacterium acnes*)、贪婪表皮细菌(*Cutibacterium avidum*)及颗粒表皮细菌(*Cutibacterium granulosum*)[原丙酸杆菌属(*Propionibacterium* species)][145]，控制皮脂腺区域[那些产生皮脂的区域如背部、前额和耳后褶皱(耳后)和鼻翼褶皱(鼻子侧面)]占主导地位，而葡萄球菌属和棒杆菌属在潮湿部位，如腋窝[12,144]，占主导地位(图16-3)。细菌的多样性与差异性会由于身体部位的不同而不同。皮脂腺部位的多样性最低，而干燥部位的多样性和均匀度均最高[144]。令人惊讶的是，手掌部位的皮肤微生物组群的丰富度与肠道相似。Fierer等发现51名健康受试者手掌含有4742种微生物，平均单掌为158种[138]。真菌也是人体皮肤微生物群的重要组成部分。除足部外，马拉色菌属(*Malassezia*)是大多数皮肤部位的优势属，其他属如曲霉属(*Aspergillus*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)及红酵母菌属(*Rhodotorula*)占优势[146]。皮肤病毒组近期才开始研究。Liu等调查了痤疮患者和健康对照中分离出的痤疮表皮杆菌噬菌体和菌株中的捕食-被捕食关系，结果表明噬菌体裂解作用具有科水平依赖性，而来自其他进化支的菌株具有抵抗性[147]。Hannigan等调查了从16名受试者的8个身体部位获得了病毒样颗粒，与细菌一样，观察了部位的特异性分布。假单胞菌、芽胞杆菌、葡萄球菌及表皮菌的噬菌体是人体皮肤中的主要原核病毒，人乳头状瘤病毒是人体内最主要的真核病毒[148]。

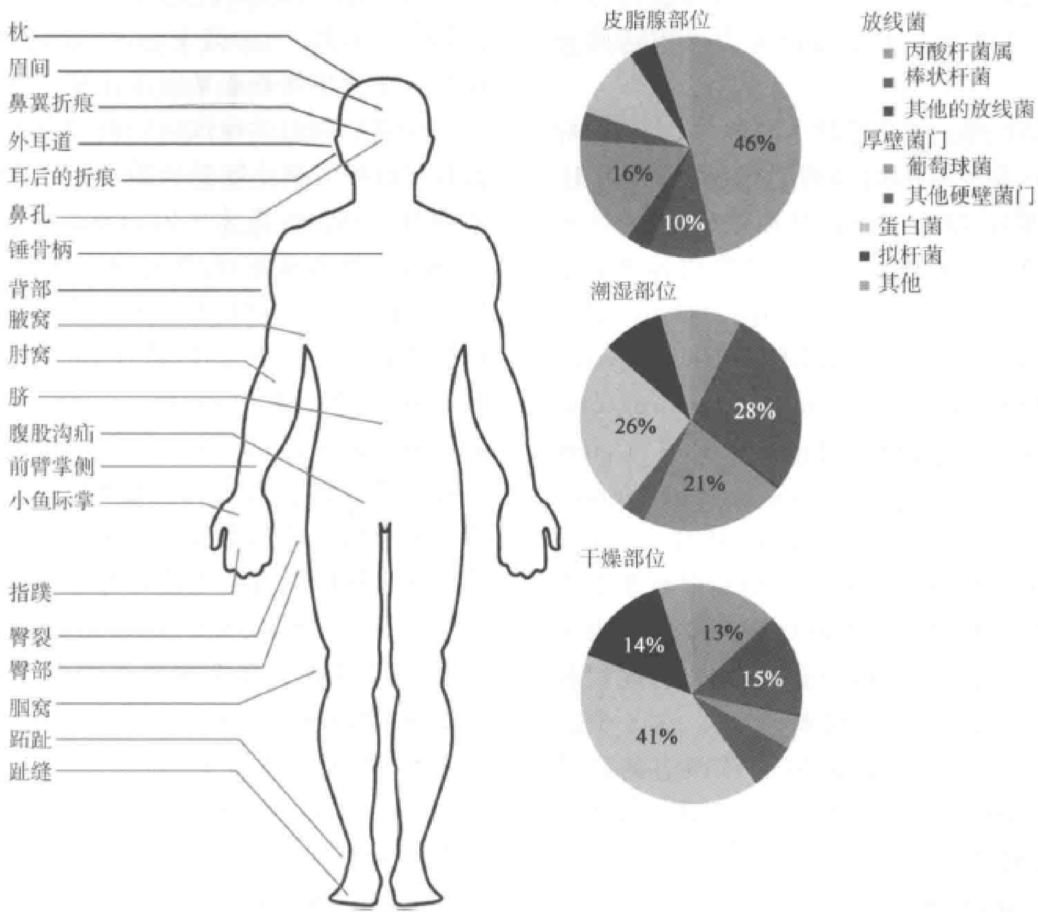


图 16-4 健康人体皮肤不同位置的微生物组成。皮脂质(蓝色文本)、潮湿(橙色文本)和干燥(绿色文本)的部位在解剖学图上都有标记,不同部位的微生物组成不同(右边的饼状图)。主要有4门:放线菌门、厚壁菌门、变形菌门及拟杆菌门。在这些门中,有3个最丰富的细菌属:表皮细菌属、棒杆菌属及葡萄球菌属[171]。此图片引用已获得Elsevier的许可,见彩插

微生物组成明显与慢性皮肤病相关,尤其是寻常痤疮和特应性皮炎(atopic dermatitis,AD),而对于其他皮肤病,如银屑病和酒渣鼻,其与微生物群之间的联系是推断得出的,还尚未得到明确证实[149-152]。对130多株痤疮表皮杆菌进行了测序和基因组学比较研究显示,只有特定的菌株(6种核糖类型)与痤疮相关;这些菌株含有潜在的毒力因子。其他非致病菌株在健康人群中定植而不致病[153-154]。特应性皮炎也称为湿疹,屏障功能丧失和宿主产生的抗菌肽[155]减少导致微生物尤其是金黄色葡萄球菌[156]的定植和感染增加。加利福尼亚大学圣地亚哥分校的Richard Gallo的研究小组发现,从特应性皮炎患者皮肤中分离出的表皮葡萄球菌和人葡萄球菌的特定菌株,在体外和体内表达能够杀死金黄色葡萄球菌的抗菌肽[130]。该活性可归因于从一株人链球菌中分离到的2株抗生素抗菌肽,这些抗菌肽抑制了金黄色链球菌在体外的生长但不抑制人源性链球菌、表皮链球菌或痤疮棒杆菌的生长。一项针对特应性皮炎患者的小型人体试验证实,接种一株表达抗生素的菌株可以显著降低皮肤上金黄色葡萄球菌的数量[130]。这些结果表明,靶向生物治疗可能最终发展成为治疗或减轻特应性皮炎症状的一种新疗法。

四、参考菌株基因组

HMP的关键任务是找出定植在人体的微生物和病毒基因组的序列,进而创建参考基因组目录[157],本目录目前存放在http://www.hmpdacc.org/catalog/,在撰写本文时,目录已经列出3055个细菌条目,其中1661个是完整的。在某些情况下,同一物种的多个分离株已经进行了测序。真核生物和病毒分离株也是参考基因组计划的组成部分。尽管来自胃肠道和口腔的菌株所占比例

过高，但是该协会仍在寻求指定菌株并进行分离测序，并且在身体5个主要部位努力寻求这些分离株。

最初HMP协会使用罗氏454长尾、末端配对测序等来进行参考基因组序列测定，现已经被Illumina公司测序HiSeq平台高通量(ca. 100×～400×)短读测序所取代。读取的结果用各种汇编程序进行组装、如Velvet (http://www.ebi.ac.uk/～zerbino/velvet)、ALLPATHs(https://www.broadinstitute.org/computationalrd/computational-research-and-development)或Celera Assembler (http://wgs-assembler.sourceforge.net/wiki/index.php?title=Main_Page)。目前正在处理的所有基因组序列几乎均是用数十个无序支架构成的全基因组鸟枪测序序列草图。为了证明这些序列草图的本质，一套以命名法、规则和标准为基础的方法建立了起来[157-158]。这5个层次是：①标准草图；②高质量草图；③改进的高质量草图；④直接用注解再改进；⑤完成图。从基本的组装序列(标准草图)到组装成一个连续块件(完成图)即金标准级的完整基因组，上述工作要求每100 000 bp错误数应小于1 bp，所有重复序列(包括rRNA操纵子)应全部正确排序。大多数(约70%)HMP的参考基因组是高质量草图，高质量草图定义为基因组中>90%的重叠部分长度超过500 bp，>90%的基因组覆盖>5倍，重叠群平均长度>5 kb，重叠群N50>5 kb，支架N50>20 kb。

HMP协会开发了一种用于基因发现、基因调用和基因注释的方法，该方法包括基因查找算法微光(Glimmer)[159]和基因标记(GeneMark)[160]以及建立来自BLAST搜索NCBI的非多余的细菌核苷酸和蛋白质数据，然后到Pfam数据库(http://pfam.xfam.org)中对比调整蛋白质的基因调用方法。同时HMP协会还建立了一个自动化的注释流程如tRNAscanSE来识别tRNA基因[161]和RNAmmer[162]和Rfam[163]来预测非编码RNA基因。基因产物的注释是基于几个程序中的证据，如InterProScan[164]、PSORTb[165]和KEGG (http://www.genome.JP/kegg/)。蛋白质统一按酶学命名委员会和JCVI原核标注流程[166]建议的描述来命名。虽然这些工具中的大多数仍然是相关的(未包括CRISPR注释)，但流程不再可用。NCBI最近开发了一种新的基因调用和注释流程[167]。微生物基因组整合(IMG/M)也包含了微生物和亚基因组注释工具[168]。

在微生物组学和致病学的研究中，HMP为人类特异性参考微生物基因组奠定了基础。新改进的测序平台和技术(Illumina的双端测序和PacBio的插入文库)的开发使得廉价、高通量的微生物基因组测序和高质量的组装成为可能，并且进展显著。撰写本文时，已有130 581个原核基因组保存在NCBI中(https://www.NCBI.nlm.nih.gov/genome/browse/)。虽然这些基因组中只有一部分属于人类微生物组，但其影响是显著的。人类病原体的数量继续超过共生体，但某些关于共生基因组的示例值得注意。这些共有基因组包括846株屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)基因组、509株表皮葡萄球菌基因组、177株溶血葡萄球菌(*Staphylococcus haemolyticus*)基因组、1460株痤疮棒杆菌基因组、111株长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)基因组、65株缓症链球菌(*Streptococcus mitis*)基因组及53株卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)基因组。基因组测序是向物种水平添加已知或未被培养出的人类微生物组成员[169]。全基因组测序也导致许多分类变化。例如，*Clostridium difficile* 现在重新分类为 *Clostridioides difficile*。如前所述，*P. acnes* 现在称为 *C. acnes*，许多链球菌和凝固酶阴性葡萄球菌有了新的物种名称。对于宏基因组的研究，参考目录还远远没有完成，因为大量宏基因组数据仍未分类。

五、总结

人类微生物组包括多种多样与人相关的微生物，但这只代表了其他动物、生命形式和环境中微生物"宇宙"总量中很一小部分。人类微生物组的精确认识基于先进DNA测序技术与生物信息学技术的快速发展。生物信息学工具包括扩充的系统发生序列数据库、注释和基因组组装工具等，同时，用精准、有效的方法来汇总序列数据，并且应用宏基因组学方法能够洞察身体不同部位和不同个体中的微生物组成及其功能差异。

在某种程度上，未来医学微生物学的进展将由宏基因组学的发展和人类微生物组研究来塑

造。对单一微生物感染的鉴定将会用探索各种感染或其他疾病状态下的微生物组的技术来弥补。非感染性免疫介导性疾病和慢性疾病状态微生物组成的差异，可能会将医学微生物学实验室的工作延伸从而“到达”人类医学的其他领域。最后，新的宏基因组学研究将会促进病原体鉴定的相关研究（第17章），这些研究可能会揭示感染性疾病的单一致病因子及特定身体部位的微生物群落变化，从而有助于感染性疾病的防治。

参考文献请扫二维码查阅

第17章 微生物基因组学与病原探索*

JENNIFER K. SPINLER,JAMES VERSALOVIC

(周宏伟 译;顾兵、倪语星、宁永忠 审校)

微生物基因组学帮助我们通过测序发现了许多以前未曾确定的细菌、古菌和病毒,极大地提高了我们对微生物多样性的了解。由人类微生物组学(第16章)和宏基因组学所带来的大规模DNA测序工程和生物信息学(bioinformatics)的发展,产生了大量人类相关的微生物数据。随着人类微生物学研究体系迅速发展,发现和鉴定引起人类感染性疾病新病原菌的机会越来越多,已经超越了过去在医学微生物学实验室手工培养病原菌的方法。本章重点关注与人类感染相关的具体病原菌或已确定的病原菌,而不是疾病状态下微生物的组成和生态(第16章)。本章结尾将描述微阵列技术和核酸测序技术是如何重新发现和鉴定病原体的。相关科学发展时间线见图17-1。

17世纪末,安东·范·列文虎克(Anton van Leeuwenhoek)发明的显微镜使人类首次观察到了前所未见的"微小动物(animalcules)"。他在口腔中观察到人类相关细菌,这为微生物的多样性和广泛性提供了第一个物理证据。微生物学上另外一个巨大的飞跃发生在大约200年以后,罗伯特·科赫(Robert Koch)通过分析感染炭疽杆菌的牛血液,首次证明细菌可以通过纯培养生长。随后以他的名字命名了微生物疾病因果关系的假说。在接下来的100年里,微生物培养和显微镜检查是仅有的可以直接检测人类微生物的工具。然而,在20世纪的最后20年里,通过rRNA基因保守序列及其他基因靶点的DNA扩增技术检测出了在实验室培养过程中遗漏的各种细菌、病毒和其他微生物。如今,核苷酸测序技术可全面描述存在于人类身上的微生物群(即人类微生物组)或者其他任何生态栖息部位的微生物,而不再依赖微生物培养或显微镜检查等方法。

一、病原微生物发现简史

(一)经典方法

微生物的发现在很大程度上取决于实验室培养微生物和通过显微镜直接观察微生物形态的能力。时至今日,实验室仍然会将与具体疾病临床表现相关、被认为含感染源的体液或者组织标本接种到微生物培养基上,从而来培养其中的微生物。利用选择性或非选择性生长培养基、生物化学和血清学试验来鉴定可疑细菌。当疑似病毒感染时,则需要把标本接种到原代或连续传代的人类和哺乳动物细胞系,然后通过细胞病变效应(光学显微镜)、免疫学方法(基于不同抗血清的血清学反应)和病毒的颗粒形态(电子显微镜)等方法对病毒进行鉴定。近几十年来,微生物实验室利用临床标本分离病原体和生物医学研究,通过临床标本作感染动物模型来证明科赫假设。这些经典的方法已经发现了许多人们熟知的病原体,如,炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、黄热病毒(Yellow fever virus)和脊髓灰质炎病毒(Poliovirus)。然而,传统方法有两个基本的局限性:①这些方法依赖于微生物在实验室培养基中的生长能力;②即使微生物可以培养,对未知微生物也可能无法准确地鉴定。

---

*注:本章包含Jennifer K. Spinler、Peera Hemarajata和James Versalovic在本手册第11版手册第16章中呈现的部分内容

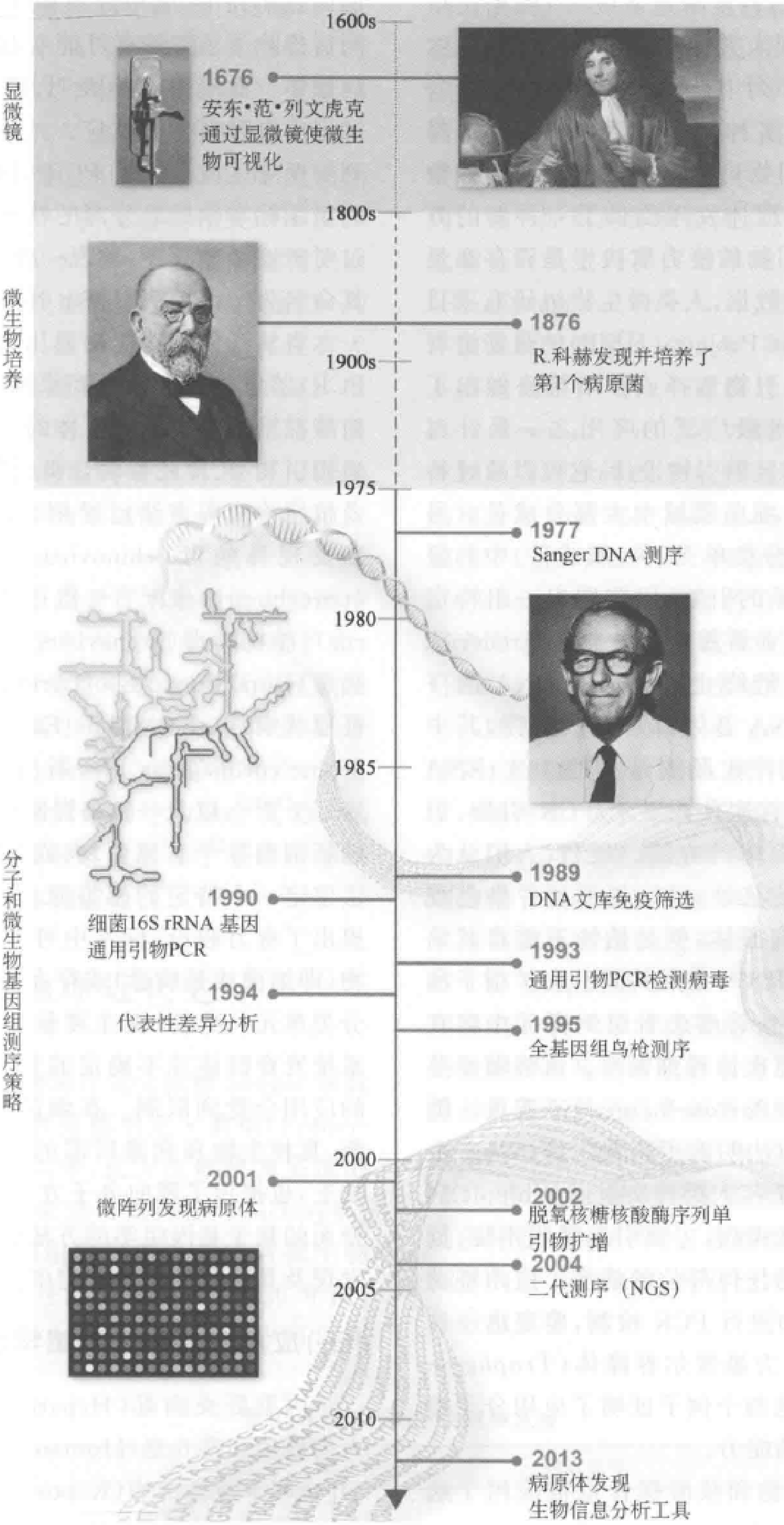


图 17-1　促进医学微生物学和分子微生物学病原体发现的重大事件时间表，见彩插

(二)应用分子生物学策略发现病原体

20 世纪 80 年代,科学家开始应用 DNA 扩增技术直接检测并发现人类标本中多种不同的微生物。针对一组已知序列中高度保守区域(例如,一个共同的分类群中多种细菌或几种病毒)选择 DNA 探针或 PCR 引物可检测出以前未明确的微生物,这一认识为病原体发现提供了一种新的方法。设计高度保守引物的能力取决于是否存在足够数量的 DNA 序列数据,人类微生物组研究项目(Human Microbiome Project, HMP)的最新进展为改良细菌属、种的引物选择或扩增策略做出了巨大贡献。这项技术最广泛的应用之一是针对 16S rRNA 基因保守区的引物设计,它可以通过特异引物的选择,测出细菌领域中大部分成员。另外,针对一个特定的分类单元(科、属或种)中的保守区可以选择更特异的引物,以鉴定出一组特定的微生物。1977 年,弗雷德里克·桑格(Frederick Sanger)发明了带有链终止抑制剂的 DNA 测序法[1]使整个 16S rRNA 基因都可完成测序,其中就包括了 1978 年测序大肠埃希菌的 16S rRNA 基因[2]。Relman 等首次使用共有 PCR 引物、识别特定人类疾病病原体的方法。最初,人们认为细菌性血管瘤具有传染性,通过组织切片染色观察到了一种可能的病原体,但是始终不能将其培养出来。利用 16S rRNA 基因共同引物扩增子测序研究证实,细菌性血管瘤患者组织样品中存在以往尚未明确的立克次体样细菌[3]。该细菌经鉴定属于巴尔通体属(*Bartonella genus*)成员。随后又采用了类似的方法明确了惠普尔病(Whipple disease)的病因,1907 年人类首次报道 Whipple 病是一种罕见的系统性疾病,主要引起吸收不良,同时也可以引起身体的任何部位的病变。应用细菌 16S 核糖体基因引物进行 PCR 检测,鉴定出一株未知的放线菌,归类为惠普尔养障体(*Tropheryma whipplei*)[4]。这两个例子证明了应用分子检测方法发现病原体的能力。

保守的 PCR 引物和核酸探针也被应用于病毒的发现。由于病毒中并不存在细菌中类似 16S rRNA 的普通保守序列,因此必须为不同种类的病毒识别出不同的通用核苷酸序列,并为每个关注的病毒分类设计共同引物。1993 年,汉坦病毒肺综合征流行期间,出现了一个应用共同 PCR 检测鉴定病毒病原体的开创性例子[5]。在一次美国西南部健康年轻成年人罕见致命性肺部疾病暴发的调查研究中,应用经典微生物方法进行广泛检测后排除了已知最有可能引起严重呼吸道疾病的病原体。血清学试验表明,患者的血清与已知的汉坦病毒存在交叉反应[5]。针对汉坦病毒已知序列的保守区域设计了 PCR 引物,并对从濒死患者的组织标本中提取分离的核酸进行扩增分析。通过对扩增子的测序,发现一种家族新成员,最终将其命名为辛诺柏病毒(Sin Nombre virus)[5]。

自从开创性地应用通用引物 PCR(consensus PCR)鉴定细菌和病毒病原以来,已经有许多应用核酸扩增试验发现病原体的论文发表。单独使用通用引物 PCR 或者联合微生物培养、显微镜观察及抗原检测等方法已经用于检测新的微生物,如新发现鼻病毒(rhinoviruses)[6-10]、副肠孤病毒(parechoviruses)[11-16]、恰巴雷病毒(Chapare virus)、沙粒病毒(arenavirus)[17]、本迪布焦埃博拉病毒(Bundibugyo ebolavirus)[18]、中东呼吸综合征冠状病毒(the Middle Eastern respiratory syndrome coronavirus)[19]、新出现的寨卡病毒(Zika virus)[20-21],以及一种与脊髓性结肠炎综合征相关的新细菌等[22]。然而,大范围的 PCR 方法往往无法鉴定一个特定的感染源。在这些示例中,作者提出了有力假设:标本中可能存在感兴趣的微生物(即细菌或是病毒)或存在哪些特定的候选病毒分类单元。然而,在主要候选微生物或感兴趣的系统发育群体并不确定的情况下,具体分子方法的应用会受到限制。在细菌和真菌领域之外,古菌、真核生物和病毒所需的共同探针或引物相对缺乏,也提示了靶向分子方法的限制性。因此,更全面的基于基因组学的方法已经应用到病原体的发现及其特征的深入鉴定中。

(三)应用微生物基因组学发现病原体

丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)和人类疱疹病毒 8 型(Human herpesvirus 8, HHV-8)[也叫卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)相关疱疹病毒病原]的发现,是基于基因组学的分子生物学方法发现病原体的重大突破。1989 年,依赖基于 DNA 文库的免疫筛选策略在非 A 非 B 型肝炎[Non-A, non-B(NANB) hepatitis]患者体内发现 HCV[23]。由受感染的动物材料制成一个随机引

物的 cDNA 基因库，然后用 NANB 肝炎患者血清筛查，目标是鉴定 cDNA 克隆，用患者血清来识别它生成的肽序列。筛选了 100 多万个克隆，只有一个克隆特异性地与非 A 非 B 型肝炎患者血清发生特异性反应。用这个初始的 cDNA 克隆片段，终于获得了整个 HCV 基因组的序列。目前，丙型肝炎病毒被公认为是引起 NANB 肝炎病例的主要病原体。1994 年，在艾滋病相关的卡波西肉瘤病变中发现，HHV-8[24]。卡波西肉瘤相关疱疹病毒的鉴定依赖于代表性差异分析方法（一种基于杂交的消减方法），在卡波西肉瘤中存在有大量独特的序列，但在对照的健康组织中未见。虽然这 2 个示例展示了早期基于基因组学策略的潜在效用，但是随后的成功案例很罕见，最有可能的原因是由于以基因组学为基础的第一代方法中存在技术方面的挑战。

到 20 世纪末，基于培养技术发现微生物的传统方法已被早期分子学和基因组学方法所扩充，如通用引物 PCR、文库免疫筛选，以及代表性差异分析等。同时，特定微生物的参考基因组测序（reference genome sequencing）也变得可行，它为病原体发现和微生物基因组测序的融合奠定了基础。21 世纪，人类需要继续发展基于基因组学的方法来提高发现病原体的能力。

二、微生物基因组学近代史

在 20 世纪，微生物测序完全依赖 Sanger 双脱氧测序法，自 1977 年弗雷德里克·桑格（Frederick Sanger）发明此法以来，此方法便成为主流的测序方法[1]。1995 年流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）全基因组测序的完成宣告微生物基因组学时代的正式开始。然而，早在 20 年前，大家已经认识到：一个生物体基因组测序可以用于分类和定义原核生物和真核生物的亲缘关系[25]。当流感嗜血杆菌基因组完成测序时，这种细菌便成为第一个基因组进行完整测序的独立生存生物体[26]。这是一个里程碑式的成就，其引人注意之处还在于它使用了“鸟枪”法组装完整的基因组。“鸟枪”法是指 DNA 随机片段化和克隆后，计算组装重叠区域以产生一个完整的基因组序列。这一原则的证明是随后对更大微生物和真核生物基因组进行测序的基础。第二年，酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）成为第一个被完全测序的真核生物[27]，1998 年，测序并发表了第一个多细胞真核生物——秀丽隐杆线虫（*Caenorhabditis elegans*）[28]的全基因组序列。自此，许多人类和动物病原体的全基因组都进行了测序，包括结核分枝杆菌（*M. tuberculosis*）[29]、鼠疫耶尔森菌（*Yersinia pestis*）[30]和恶性疟原虫（*Plasmodium falciparum*）[31]等著名的病原体。2004 年，研究者发表了目前已知最大的病毒——米米病毒（mimivirus）1.2 Mb 的全基因组序列[32]。

随着二代测序（next generation sequencing，NGS）方法的引入，DNA 测序技术于 2005 年开始了一场革命，大大改变了测序在医学微生物学中的应用。NGS 革命是由 454 技术[33]（Roche）所采用的基于微液滴的乳液 PCR 方法引发，多个 NGS 平台根据其短读长或长读长的测序技术分层（表 17-1）。已有文献对每一个平台和功能都进行了详细的回顾[34-35]，与 Sanger 测序相比，这些平台的关键特征是都指数级地增加了原始序列生成能力并显著降低了每个碱基的核算成本。随着测序能力的增加，微生物基因组测序已成为常规手段，NGS 平台已经使科学家能全面探索人类微生物组的多样性（第 16 章）。这些努力极大地扩展了可测序的微生物范围，并且这些序列已经储存于各个数据库中。

表 17-1 二代测序仪器和方法

NGS 仪器（公司）	推出年份	测序方法	读取长度	错误谱
短读技术：				
454（Roche）	2004	SBS	400～700 bp SE	1%，插入缺失
SOLiD（ABI）	2007	SBL	50 bp PE	≤0.1%，AT 偏差
Ion Torrent PGM（Thermo Fisher）	2010	SBS	200～400 bp SE	1%，插入缺失

（续 表）

NGS仪器(公司)	推出年份	测序方法	读取长度	错误谱
HiSeq(Illumina)	2010	SBS	250 bp PE	0.1%，替代
MiSeq(Illumina)	2011	SBS	250 bp PE	0.1%，替代
GeneReader(Qiagen)	2015	SBS	107 bp SE	不适用
NovaSeq(Illumina)	2017	SBS	150 bp PE	不适用
长读技术：				
SMRT(Pacific Biosciences)	2010	SMS	>20 kb SE或环状一致性	单次13% ≤1% 循环共识，插入缺失
MinION(Oxford Nanopore)	2014	SMS	>300kb，1D 60 kb，2D	12%，插入缺失

注：SBS. 合成测序；SMS. 单分子测序；SBL. 连接测序；SE. 单端；PE. 双端

三、病原体的发现和微生物基因组学融合

在过去20年中，病原体发现和微生物基因组学2领域相互结合，极大地促进了病原体的发现和检测(图17-1)。2种大规模并行分析的基本分子生物学方法——微阵列技术和测序技术，能够检测临床标本中的微生物。这两种方法的发展都大大受益于人们日益增加的对人体微生物测序的关注。多个核酸序列数据库提供了用于设计测序用的通用引物PCR引物和微阵列探针的基础数据。在过去的十年里，测序技术迅速发展，用于发现和检测病原体的NGS分析流程也已形成。测序技术正在迅速取代微阵列芯片杂交方法，但微阵列技术仍然是细菌和病毒检测的一种有用的选择。无论这些数据是微阵列还是测序平台产生的，数据分析或生物信息学工具和分析流程都正在改进和完善，以迎接基因组学和临床实验室“大数据”的挑战。

(一)基于微阵列的方法

微阵列(microarray)最早开发于20世纪80年代初，目的是以高度并行方式分析单一生物体基因表达模式[36]，早期研究分析了酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的每一个基因[37]。不管哪一种技术形式，核酸杂交都是所有微阵列的基本原理。如果一个特定样本序列与阵列中的序列互补，就会发生杂交，因此，一个给定的微阵列能够检测到的目标序列是有限的。20世纪90年代末，DNA微阵列技术的发展凸显了其可能会成为优秀微生物诊断工具的巨大潜力。微阵列内在的高度并行性质，加上不断增多的微生物测序数据，使人类可能设计出能同时检测各种不同微生物的微阵列。

微阵列技术首次显著成果是广泛病原体识别芯片的开发，可用于检测各种已知的呼吸道病毒[38]。该芯片包含约1600个寡核苷酸，涵盖了能引起的呼吸道疾病所有病毒族成员中的140种。随后，又设计了一个更为全面的阵列——病毒芯片(ViroChip)，它由当时基因组库(GenBank)中每个已经完成全测序的病毒基因组衍生出的寡核苷酸制成[39]。寡核苷酸探针是从每个病毒类别中挑选出的高度保守的70聚体，通过交叉杂交就能够检测出已知和未知的病毒家族成员。然后用提取到的核酸样品进行随机扩增，并用荧光染料(通常是Cy3或Cy5)标记。微阵列上获得的杂交谱分析出来，可用以推断是否存在已知或新的病毒。已开发了许多分析微阵列数据的方法，包括可视化检测、层次聚类[40]和几个已上市的生物信息学软件，如GreeneLAMP[41]、E-predict[42]、DetectiV[43]、PhyloDetect[44]、VIPR[45]及VIPR HMM[46]。2003年，严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome，SARS)暴发，ViroChip成功鉴定出其致病原是一种新型的冠状病毒[39,47-48]。

除了ViroChip，还报道了其他宽范围的DNA芯片。格林芯片(GreeneChip)是一种包含了检测病毒、细菌、寄生虫许多探针的泛微生物芯片(pan-microbial microarray)[41]，这种芯片已在各种诊断场景中成功地检测出已知或未知的病毒[49-53]。重测序病原体微阵列芯片包含9种A型

流感亚型、11种鼻病毒、28种肠病毒及38种其他呼吸道病毒探针[54]，而TessArray可以检测并区分97种微生物，包括细菌、病毒、原生动物及生物恐怖病原体[55]。劳伦斯-利弗莫微生物检测阵列(Lawrence Livermore microbial detection array)是一种高密度芯片，包含的目标探针是针对每一个已取得全基因组序列的细菌和病毒，目前正在开发中[56-57]。这种阵列，再结合以多重置换、扩增为基础的、通过Φ29聚合酶等温扩增的全基因组扩增，已成功地用于检测各类临床标本中存在的DNA和RNA病毒[58]。PathChip是另一种可选用的病原体芯片，利用杂交前随机标记(random-tagged)PCR，可用于鉴定呼吸道感染患儿鼻腔洗液标本中的病毒病原体[59]。最大的病毒检测微阵列之一——脊椎动物病毒的病毒捕获测序平台，是使用覆盖207个病毒类群基因组的约200万个探针开发的[60]。DNA芯片也可用于病毒亚型的鉴定，如流感病毒A[61]。

在细菌方面，基于微阵列的检测已成功地从几种感染类型中识别出了细菌病原体，如菌血症(bacteremia)[62-64]、泌尿生殖系统感染[65,66]及感染性腹泻[67]。专测16S rRNA基因序列的探针芯片已发展到具备检测样品中细菌的多样性的能力。Phylo芯片(PhyloChip)是一种高密度的16S rRNA基因芯片，其包含约300 000个探针，可用于检测包括城市气溶胶、表层土壤和地下水在内的3种环境样品中的微生物多样性[68]。这项研究表明，这种基因芯片可以揭示广泛的微生物多样性。另一种芯片含有10 500个探针，包括9000种针对16S rRNA基因的分类学特异性探针，可用于系统定量研究婴儿胃肠道定植菌[69]。除了以16S rRNA基因为基础的技术外，最近，使用*gyrB*基因序列的芯片已经能成功检测并区分军团菌(*Legionella*)的多个种和亚种[70]。将微阵列的检测结果与已测序的结果进行对比，显示了微阵列的优势。

由于真菌培养的烦琐性，使用经典方法鉴定真菌病原体耗时且具有挑战性。微阵列技术可以实现直接对临床标本进行检测，从而简化了真菌鉴定。类似于通过16S rRNA基因序列进行细菌的鉴定，使用微阵列鉴定真菌利用的目标基因有28S rRNA基因和rRNA基因簇中的内转录间隔区段(internal transcribed spacer，ITS)。基因芯片技术已应用于鉴定人类常见的真菌病原体，包括念珠菌属(*Candida*)、曲霉属(*Aspergillus*)及镰刀菌属(*Fusarium*)等[71-72]。真菌感染的诊断已通过等温DNA扩增和比色可视化的微阵列系统进一步优化[73]。这种创新的微阵列设计使用重组酶聚合酶扩增技术来标记和扩增DNA产物，在可识别42种临床相关真菌的技术平台上进行检测。使用化学显色反应可实现杂交阵列的可视化，该化学显色反应结果可以通过肉眼进行直接观测，无须昂贵的荧光扫描设备。

微阵列技术的创新，进一步增加了微生物检测的通量、加快了样本周转时间。芯片实验室(lab-on-a-chip)将微流体技术与逆转录、PCR扩增和微阵列杂交相结合，可鉴定多种重要的热带病原体[74]。微球芯片技术是一种数字悬浮阵列，它结合了具有独特光学特性的NGS技术和微球，而非点状平面阵列[75]。微球芯片技术的固有性质有：探针序列功能的多样性，快速检测样品中报道分子的选择以及对于目标DNA特定序列的二代测序(NGS)分析。微球芯片验证研究已用于人乳头瘤病毒的基因型检测。

在基因组学时代，微生物诊断用基因芯片技术取得长足发展，在公共基因数据库产生了丰富的微生物序列。病毒芯片(ViroChip)的成功实践证明，基因芯片是一个强大的发现病毒和其他病原体的技术平台。微生物组研究直接影响了最新的Affymetrix芯片技术，即Axiom微生物组阵列。这项技术和相关的分析软件，即Axiom微生物检测分析软件(MiDAS)，可在单次可扩展的分析中对从古细菌到细菌、真菌、原生动物和病毒等12 000多种物种进行菌株水平检测。但是，所有基于杂交的用于检测病原体的策略(包括DNA微阵列)的明显局限性在于：序列必须已知且特征明确。与此相反，DNA测序方法则是为寻找病原体提供一个开放端口(open-ended)，它不依赖于特异性探针的事先设计。通过DNA测序平台所产生的数据，可以作为虚拟的"探针"，加上DNA数据库来鉴定出令人意想不到的病原体。

(二)基于测序的方法

2001年，采用传统的病毒培养方法结合一种名为随机任意引物PCR的分子策略，发现了人类偏肺病毒(human metapneumovirus，HMPV)，将

微生物基因组测序技术融合入病原体发现的探索中[76]。研究者对呼吸道感染患儿的呼吸道分泌物进行培养，一种不明的病毒可以在哺乳动物细胞系进行传代培养。采用任意引物扩增得到PCR产物，这些扩增物仅存在于受感染细胞，然后有选择性地用Sanger测序方法测序。多个片段的限制性序列检测结果与家禽肺炎病毒属相似，表明在感染细胞内存在着一种新的病毒，现在称之为HMPV。血清流行病学研究表明，该抗体在大多数5～10岁儿童中为阳性，提示该病毒是一种在儿童期获得的常见病毒。HMPV引起的症状类似于呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus，RSV)，但呼吸道感染程度比它更严重，包括肺炎和毛细支气管炎，因患呼吸道感染住院的患者中的5%～10%由HMPV引起[77]。同年科学家提出一种可供选择的非序列依赖法——DNase-SISPA[78]，用于鉴定新型病毒。这种方法是近10年发现新病毒的方法学基础。它基于不依赖序列的单引物扩增方法(sequence-independent single primer amplification，SISPA)，其中每个接头包含一个引物结合序列，将它连接到一个cDNA片段的两端，然后用于PCR。为了富集病毒颗粒中的特异性病毒核酸，首先对临床标本进行超高速离心，收集病毒颗粒，随后用DNase降解不受病毒衣壳保护的所有细胞核酸。经过富集后，提取样品DNA或RNA，再利用SISPA进行扩增。在试验中富集是必要的步骤，用来增加导出病毒序列的概率，减少了对未富集的样本进行广泛Sanger测序的工作量和成本。在这项概念验证的研究中，鉴定出了2种新的牛细小病毒(bovine parvoviruses)[78]。接下来的几年，SISPA以及该方法的一些改良法，已成功地应用于发现许多潜在的致病病毒与同源性较低的已知病毒序列。这些新病毒的鉴定，凸显了核酸测序在病毒检测中的实用性。基于DNase-SISPA的方法与高通量测序法结合进一步推进了病毒发现的进程。2005年，在多个不明原因的呼吸道疾病患者的呼吸道分泌物核酸混合池中发现了人类博卡病毒(human bocavirus，HBoV)[79]。用一个384孔板对600～1500 bp扩增产物进行克隆和高通量Sanger测序。系统发育分析表明，这种新的基因组是一个以前未知的博卡病毒属中的一种，即HBoV。随后对该病毒的研究发现经常能在呼吸道感染、哮喘发作及急性胃肠炎的患儿中检测到HBoV。血清流行病学研究证实，在日本人群的一次HBoV感染中，6岁以下接触过该病毒的儿童中感染总患病率达71.1%[80]，在瑞典的另一项研究报道显示感染患病率比日本低，急性喘息患儿中感染患病率为33%[81]。相同的方法用于多种类型的样本研究，发现了一些新的病毒及尚未被确认为病原体的病毒。这些发现表明，非序列依赖扩增法加上限制性Sanger毛细管测序(通常<384个克隆)的联合扩增产物是鉴定临床标本中新型病毒的稳定的方法。NGS技术的出现，使得标本测序的深度得以增加，能测出标本中较低丰度的微生物并促进新一代的新型微生物全基因组的产生。2008年，发现了默克尔细胞多瘤病毒(Merkel cell polyomavirus，MCPyV)，这是第1个在罗氏454 FLX平台使用NGS识别出的一种新病毒[82]。在此例中，用默克尔细胞癌组成的cDNA文库进行测序，从生成约382 000个高质量的序列中，检测到一个片段序列与一个已知的多瘤病毒相似。进一步的分析表明，一个高度趋异的多瘤病毒基因组，即MCPyV，存在于受检的大部分默克尔细胞癌中。随后的研究也证实了这一发现，整合位点分析证明了病毒克隆整合在各自的肿瘤中。在这些样本中，MCPyV mRNA序列丰度非常低，如果没有NGS平台，病毒转录的检测将不可能完成，这使得使用NGS平台以低成本方式对样本进行深度测序变成可能。用NGS技术鉴定出的其他新肿瘤相关病毒(表17-2)。

NGS 454 FLX在定义几个原因不明的传染病病因中发挥了十分重要的作用。第1次是未确诊的5位出血热患者神秘案例[83]。从2份尸检肝活检标本和一份血清样本获得的RNAs随机扩增并进行测序，分析约300 000个序列得到9个片段，这些有限的序列与沙粒病毒属(genus Arenavirus)中的病毒相似。新型Lujo病毒(Lujo virus)进化分析表明，它可能是旧沙粒病毒复合体的分支，与莫博拉病毒(Mobalavirus)、拉沙热病毒(Lassa fever virus)及塔米埃米病毒(Tamiami virus)有很高的相似性，核蛋白中氨基酸同源性达到67%～74%。进一步对G1蛋白结合受体进行检验，证明旧型和新型沙粒病毒有着同样的距离。寨卡病毒(Zika virus)的基因组流行病学和系统发育研究是NGS技术在病毒流行病学领域的最新

表 17-2 通过 NGS 方法发现的新型病毒

病毒	标本类型	发现方法	疾病	参考文献
默克尔细胞多瘤病毒(Merkel cell polyomavirus)	默克尔肿瘤细胞	罗氏 454FLX	默克尔细胞癌	82
EBV 1 型(Epstein-Barr virus type 1)	鼻咽癌活检	Illumina 基因分析仪 IIX	鼻咽肿瘤	134
CNS[a] 淋巴瘤病毒(EB 病毒、CMV、JCV、HIV)[CNS[a] lymphoma viruses(Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, JC virus, and HIV)]	原发 CNS 淋巴瘤 RNA	下一代转录组测序	中枢神经系统淋巴瘤	135
Lujo 病毒(Lujo virus)	尸体肝活检 RNA	下一代转录组测序	出血热	83
Human klassevirus 1	小儿粪便	罗氏 454FLX	腹泻	136
Torque Teno virus Hebei-1(TTV)	血液	多位移放大和 IonTorrentPGM 系统	未知病毒感染	137
新泽西州多瘤病毒(New Jersey polyomavirus)	胰腺移植患者肌肉活检	IonTorrentPGM 系统	视网膜失明和血管性肌病	138
鼻病毒 C(Rhinovirus C)	鼻咽拭子	VIDISCA-454	未知的呼吸道感染	139
人乳头瘤病毒(Human papillomavirus)	小儿粪便标本	454 GS-FLXtitanium	腹泻	140
埃克波马病毒 1 型(Ekpoma virus-1) 埃克波马病毒 2 型(Ekpoma virus-2)	血液	Illumina HiSeq 2500	无法解释的急性高热病	141
杂色松鼠博纳病毒 1 型(Variegated squirrel bornavirus-1)	人脑标本	Illumina Miseq	致命性脑炎	142
新型痘病毒(Novel poxvirus)	病灶清创接种的感染细胞培养物	454 GS20 和 Illumina 测序仪	腋窝病变	143
波旁病毒(Bourbon virus)	血液	IonTorrentPGM 系统	可能由蜱传播的致命的高热病	144
人内源性逆转录病毒 K 型(Human endogenous retrovirus type-K)	多物种 DNA	ChIP-seq 和 Illumina HiSeq 2000	未知	145
星状病毒 MLB2(Astrovirus MLB2)	脑脊液，血浆，尿和肛门拭子标本	Illumina HiSeq 2500	脑膜炎	146
Statoviruses(译者按：一种新分类的 RNA 病毒，存在于哺乳动物肠道内)	粪便	454 GS-FLX titanium	未知	147
Lyon IARC PyV(LIPyV)	皮肤拭子，眉毛和口腔含漱液	IonTorrentPGM 系统	未知	148
人肝炎病毒 1 型	静脉吸毒者血浆	Illumina HiSeq 2500	丙型肝炎和艾滋病毒感染	149

注：[a]CMV. 巨细胞病毒；CNS. 中枢神经系统；EBV. 爱泼斯坦-巴尔病毒；JCV. JC 病毒

热点。这种由蚊子传播的病毒迅速传播，影响了数十万人，并可能导致严重的先天性异常。使用多种基于 NGS 的方法对患者和环境样品进行病毒监测(图 17-2)，突出了病毒监测作为控制传播手段的重要性[20-21]。最近，用 454 FLX 鉴定出病因不明胃肠炎中隐蔽的其他病毒病原体见表 17-2。

要基于测序技术发现新的细菌病原体，可以通过特异性靶基因测序或使用全基因组测序(whole-genome sequencing，WGS)结合一系列数据分析工具来完成。这些工具可以用纯培养物或患者标本来组装和分析细菌基因组。图 17-3 描述了细菌 WGS 分子诊断的操作流程。在 2013 年，联合纯培养方法、PCR 扩增和 Sanger 测序 3 种方法从慢性巴尔通体病患者身上鉴定出了一个新的巴尔通体科(Bartonellaceae)。Blazes 等将 *RRS*、*gltA* 及 *rpoB* 基因作为靶点，以基于局部序列排比的搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool，BLAST)、ClustalW 及 MEGA5 软件序列分

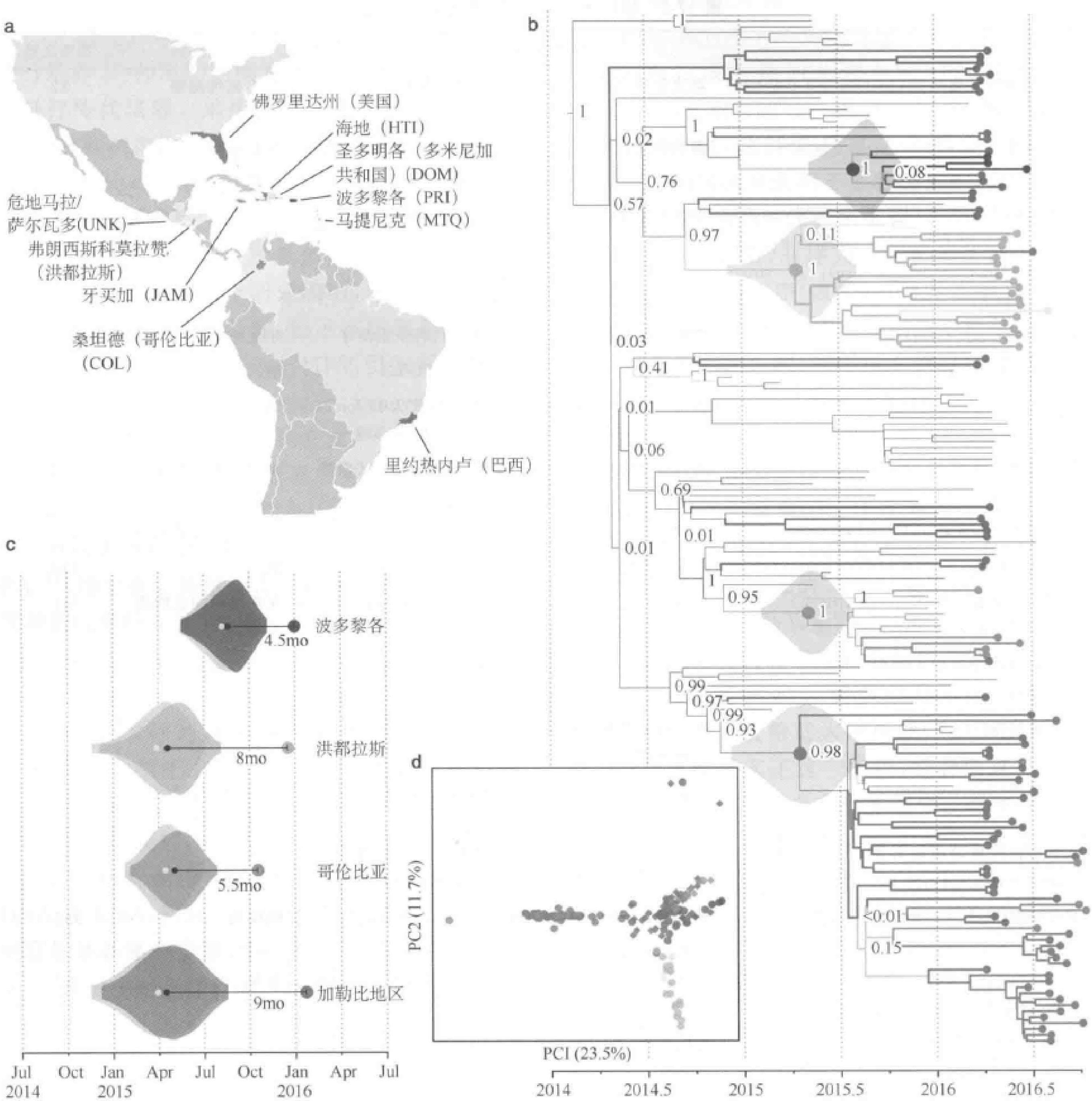


图 17-2 寨卡病毒在整个美洲的传播

注：a. 上色的国家或地区代表样品收集的位置，并突出显示特定的已知样品来源；b. 最大可复制性进化树，从这项研究中产生的基因组（虚线提示），小提琴图突出显示了最近共同祖先的概率分布；c. 从最近的共同祖先到首次确认的本地传播病例之间的时间，加勒比进化树包括美国本土；d. 变体的主成分分析，圆圈代表本研究产生的数据；菱形代表这次疫情中其他可公开获得的基因组。此图片经《自然》许可转载，见彩插

析为基础，发现该序列类似于几个其他已知的巴尔通体科（Bartonellaceae），在巴尔通体属（Bartonella）标准相似性范围之下，鉴定此新分离株为Candidatus Bartonella ancashi[84]。同年，Bhatt等[22]应用WGS对脐带结肠炎患者经福尔马林固定、石蜡包埋的活检标本进行DNA检测，确定了此疾病的另一新型病原体。以往的病因理论认为脐带结肠炎是移植物抗宿主病（graft-versus-host disease，GVHD）的一种表现形式，而并非是一种独特的临床综合征。该研究识别出一种新细菌——肠炎根瘤菌（*Bradyrhizobium enterica*）的基因组草图，该菌不存在于所有对照标本中，而只与他们分析的所有脐带结肠炎标本相关。

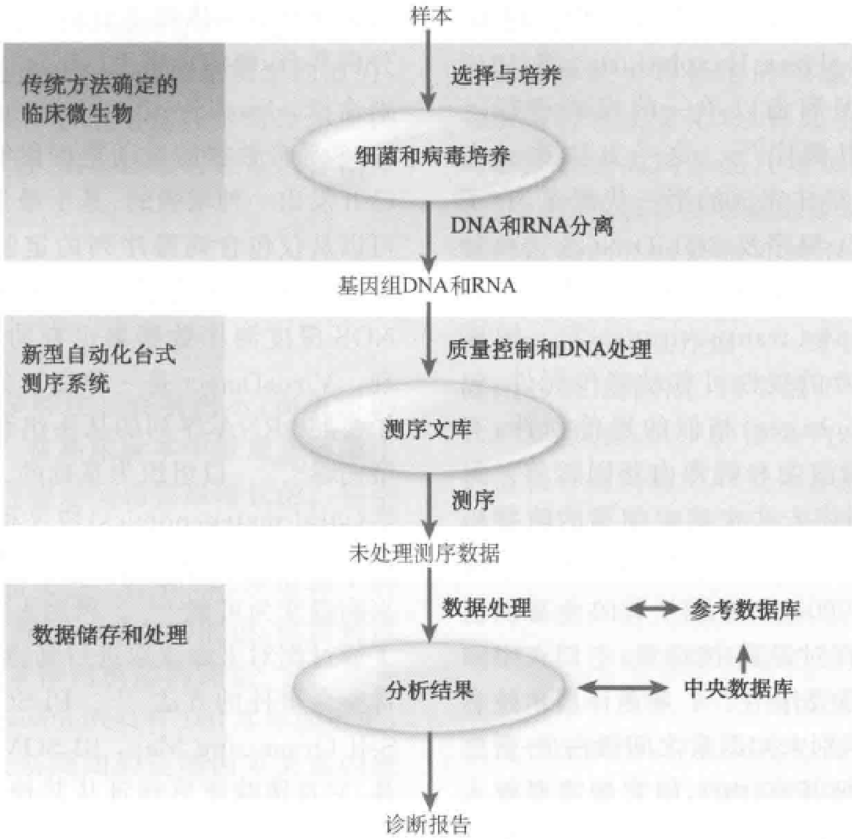


图 17-3　针对基于全基因组测序的分子诊断的拟议工作流程。该工作流程包括标本培养、DNA/RNA 提取及用于数据生成的测序。双头箭头表示中央数据库和引用数据库不断更新，见彩插

NGS 也已应用于分子流行病学领域来研究病原体的涌现。2011 年，Wright 等[85]应用 NGS 对濒死患者的样本进行培养，经过几天复苏培养后快速完成了对疑似炭疽芽胞杆菌的细菌的全基因组分析，确定其为蜡样芽胞杆菌（*Bacillus cereus*），而非炭疽芽胞杆菌（*Bacillus anthracis*）。快速基因组测序对这一致命的炭疽样肺炎病原体进行分析，明确了感染的真正病原体。2013 年，研究者首次用 WGS 作为基于基因组的分子流行病学工具，Roetzer 等[86]应用基于 WGS 的基因图谱工具在大城市追踪结核分枝杆菌的蔓延及长达 10 年的克隆传播，来确定结核分枝杆菌基因组短期变化的研究。结果表明，用 WGS 方法得到的结核分枝杆菌暴发的基因图谱比传统方法（如 IS6110 限制性片段长度多态性法、间隔寡核苷酸分型法、分枝杆菌重复单位与变数相间的重复串联分析）好得多，后者只可检出基因组<1%的序列。经过这些努力，Roetzer 和他的同事得以能确定大规模暴发流行及追踪哈勒姆家系（Haarlem lineage）结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）克隆的传播和进化。此外，WGS 已应用于检测单个患者身上存在的高毒力和侵袭性 A 群链球菌（group A *Streptococcus*, GAS），Flores 等[87]从单个患者感染的皮肤或软组织中分离出一对非侵袭性和侵袭性的 GAS 菌株，并对用 MiSeq 平台（Illumina）测的基因组序列进行了分析。这一对菌株的全基因组比较研究结果表明，侵入性 GAS 表型的出现是起源于突变，这改变了研究者既往的观念，大大增强了研究者对病原体致病性分子进化的理解。如若具备将 NGS 运用到分子流行病学和病原体进化研究的能力，可以显著增强相关人员管理和控制公共卫生隐患的能力。

NGS 的其他应用包括对具有重要历史意义的 1918 年流感病毒的研究，对新型可移动遗传元件的鉴定及对抗策略的开发，对噬菌体展示技术的结果优化。研究以往的病原体可以为科学家提供防控潜在灾难性暴发的重要信息。为了对 1918 年流感病毒进行测序，实验使用从近百

年前以福尔马林固定和石蜡包埋的肺组织分离的高度降解的 RNA，并制成 cDNA 文库。用 Illumina Genome Analyzer IIx platform，将 1918 年的普通流感 A 型病毒以单一的模式进行了 3000 倍的全基因组测序[88]。这一方法比过去 Sanger 方法用了九年才完成的第一代测序，有了较大的进步[89]。454 测序及 SOLiD NGS 这两种方法已被用来鉴定一个以前未知的可移动遗传元件——转座病毒体(transpovirons)[90]。转座病毒体是感染大病毒的线性可移动遗传元件，包含与噬病毒体(virophages)相似的遗传元件，有助于大的 DNA 病毒演变和病毒内基因转移。另外，已应用高通量测序方法来确定细菌的防御机制，毒素-抗毒素基因对及抗噬菌体防御机制。用 Sanger 平台对 1500 000 个基因开展的全基因组测序帮助识别了数百对毒素-抗毒素，它们在中和噬菌体毒素方面有重要作用[91]。噬菌体展示技术(phage display)在识别未知因素之间蛋白质-蛋白质相互作用方面是极其有用的，但它却需要极大消耗人力。将 NGS 用于噬菌体展示技术，使噬菌体文库分析能力从数百个克隆增加到数千个或更多的克隆。HiSeq/MiSeq[92-95] 和 454[96-98] 平台已经成功应用于噬菌体展示技术。NGS 方法已与其他方法相结合，如蛋白质组学和代谢建模等，来研究临床相关病原体，如单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)[99]、幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)[100] 及土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)[101] 等。NGS 技术的应用可以为这些领域提供有关新出现和再出现的病原体的及时且有价值的信息。

NGS 平台带来了分析极大的数据集("大数据")的负担，它要求生物信息学和数据分析工具的不断创新。发展生物信息学工具的主要动力源于 HMP 产生的大量测序数据[102]。生物信息学工具使用开源软件测序分析流程，即 QIIME (Quantitative insights into microbial ecology，QIIME)[103]、mothur[104] 和 VAMPS[105]。QIIME 工作流可以处理数以百万计的测序数据，进行序列比对和系统发育比较，并提供图形化显示，可以供笔记本电脑到高性能计算集群使用。新兴的病原性疾病对公共卫生构成了重大威胁，对不断积累的 NGS 数据进行检测是做好准备的关键。为了控制和预测新出现或重现病原体的暴发，科学家们开发了数据分析工具，作为监测机制，预测潜在的跨物种病原体和主要的流感株。2 个自动数据分析平台，即病毒猎手(virus hunter)[106] 和病毒识别途径(virus identification pipeline, VIP)[107]，使 NGS 平台数据的自动挖掘能够识别新病毒，并且已开发出一种增强的、基于最低共同起源的方法，可以从仅包含病毒序列的定制数据库中有效、快速地识别新病毒[108]。富含小 RNA(sRNA)的 NGS 深度测序数据集也有助于病毒的检测和发现。VirusDetect 是一种自动分析流程，可执行基于参照 sRNA 序列的从头组装，可识别已知和新型病毒[109]。以组织为基础的、用于病毒宏基因组学(viral metagenomics)协议和分析流程的通用病毒检测的发展，使得直接从器官组织精准检测新兴病毒变为可能[110]。利用人类 WGS 数据，开发了通过配对末端读取进行病毒整合检测以检测病毒整合事件的方法[111]。BLSOM(Batch-Learning Self-Organizing Map, BLSOM)[112] 是一种分析工具，它在跟踪流感病毒从其他哺乳动物或鸟类宿主入侵人类宿主后，检测流感病毒基因组序列的变化。这一分析工具能够通过测量数以百万计的基因组序列来识别潜在的新流感 A 和 B 病毒株。病毒准种谱(viral quasispecies spectrum, ViQuaS)软件利用了大多数 RNA 和某些 DNA 病毒的病毒聚合酶的高复制率和低保真特性来重建病毒准种[113]。通过获取有关病毒准种的新信息，ViQuaS 有助于抗病毒药物和疫苗的开发，并阐明了发病机理和疾病进展的机制。病原检测器[114] 可根据 NGS 数据预测细菌的致病性。除了这些新的测序分析流程外，还有当今知名的比对算法(BLAST、BLAT、BWA、BWASW、BWA-MEM、BFAST、Bowtie2 Novoalign、GSNAP SHRiMP2、STAR)，它们可以用来全面分析从 NGS 数据中挖掘出来的 DNA 或 RNA 序列，最近已评估了这些工具在识别不同的病毒序列中的准确性[115]。除分析工具外，还对数据库进行了编译，以帮助科学界从不断增长的 NGS 数据集中提取有价值的信息。NGS 相关致癌病毒发现的兴起以及随后人类基因组中病毒整合位点(viral integration sites, VIS)的鉴定，为科学家提供了丰富的数据，可用于发现人类新的致癌基因、抑癌基因和肿瘤相关途径。这些数据包含在一个全面的可搜索数据库——Dr. VIS[116] 中，该数据库有助于进行生物

信息学和实验研究，并且包含代表25种疾病的数据，这些疾病涵盖了8种致癌病毒的3340个整合位点。由于NGS具有对百年基因组测序的能力，以及用DNA分子测序数据来执行全面分子监测的能力，它为在基因组、宏基因组时代发展诊断微生物学提供了契机。

四、致病性作用的评估

广泛的微生物多样性正在被揭示，而更多的微生物仍有待发现。在临床标本中发现新的微生物（尤其是病毒）的进程是呈指数级增长的。科学界所面临的挑战是，要弄清楚越来越多的新的微生物与人类感染的相关性。1890年，罗伯特·科赫（Robert Koch）发表了一系列的假说，试图规范疾病与微生物的因果作用所需的证据[117]。尽管科赫法则（Koch's postulates）有100多年的历史，直到今天，它仍是众所周知的证明因果关系的准则。法则如下。

1. 寄生物在每一个可疑病例中都出现，并在某些情况下可以解释疾病病理改变和临床病程。

2. 该寄生物不会在其他疾病中以非致病性或者偶然出现的寄生物身份出现。

3. 把寄生物从机体中分离，在纯培养中反复转种，仍然可以导致疾病的再发生。

科赫法则在实行时存在一个重大挑战，尤其在分子时代，许多微生物不能在纯培养中生长。另一个局限性是有些微生物，如脑膜炎奈瑟菌（*Neisseria meningitides*）和结核分枝杆菌，具有携带者状态或会引起亚临床感染，这违反了科赫法则。其他限制科赫法则应用的情况还包括，两种或以上微生物感染导致的疾病，或者宿主遗传背景导致的疾病状态。科赫法则已经在许多的出版物中被重新审议。Bradford Hill[118]和Evans Alfred[119]提出了更广泛的因果关系标准，包括流行病学和免疫学数据。最近，Fredericks和Relman提出了微生物检测的分子生物学方法，以证明疾病的因果关系[120]。这些修订的科赫法则仍集中于传统概念，即疾病来自外源性微生物的存在（以及其存在的生理后果）。然而，在21世纪的基因组学时代，必须重塑"病原体"的概念及它引起疾病的机制。随着HMP[102]的到来，科学家们已经了解到人类宿主和复杂的微生物群落之间存在错综复杂的关系。人类肠道微生物组包含基因编码的核心微生物功能，这群稳定的微生物群落造就了胃肠道的功能和完整状态。微生物群落的组成变化时，称为生态失调，可能导致对感染性疾病的易感性增加[121]。按此观点，某些"疾病"状态有可能是由微生物组的紊乱引起。某种疾病的发病机制可能不仅仅是因为一种致病性微生物的存在，还可能包括微生物"界"内与人体之间的相互作用——微生物和宿主2个"界"之间的相互作用。科学家们通过比较分析健康人群和患病人群中的微生物，已开始阐明微生物群落在一些疾病中的复杂作用，如肥胖[122]、炎症性肠病[123]、自身免疫性疾病[124]及遗传性过敏症[125]。随着NGS技术的不断进步，每个测序运行时都会产生大量的数据，所以在报道一个特定病例由某个微生物引起的感染情况之前一定要仔细考虑。在从WGS或宏基因组研究出来的数据进行分析时，存在与毒力相关的基因元件并不一定能认定该微生物是感染的病原体。要确定一个微生物或毒力因子的致病原性，除了宏基因组分析外，还有几个重要的因素，如标本收集部位、宿主状态和临床表现等[126-127]。

五、通过医学基因组学确定毒力决定因素和耐药性

医学宏基因组学是不依赖培养的另一新的方法。尽管要实现在临床上成功应用宏基因组学技术仍存在明显挑战，但以宏基因组学为基础的检测流程可能成为诊断和公共卫生实验室的常规手段。WGS正在病原体分型、暴发检测和微生物全基因组关联研究中实施，但仍依赖于培养分离株。WGS在基因组监测和暴发管控中的应用[128]提供了更高的判别分析能力，并提高了菌株追踪的准确性。WGS是一种快速、准确的微生物鉴定和分型方法，能够实现流行病学跟踪，以及毒力性状和抗菌药物耐药基因检测。目前，PulseNet USA已开展使用基于WGS的监测系统，用于食源性病原体检测（https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/wgs.html）。不依赖培养的诊断检测技术的用途正在扩大，市售的多重PCR组合试剂可以同时检测多种病原微生物，检测时间从数分钟到数小时不等。这些靶向

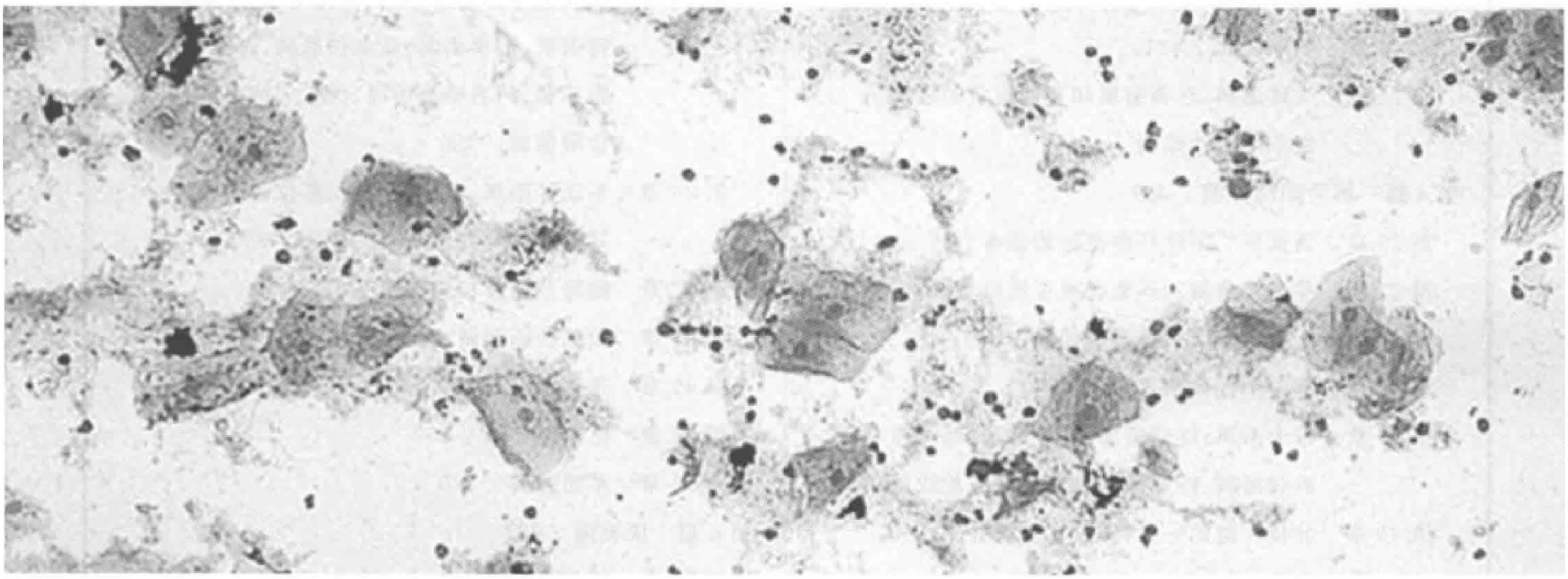
检测试剂盒提供了检测细菌感染的能力，大大缩短了基于培养的多天周转时间。当前使用的商用靶向检测试剂盒包括 BDMax 系统（BD Molecular Diagnostics）、Verigene，NxTag、Aries（Luminex）及 FilmArray 系统（BioFire Diagnositics）。然而，这些靶向检测试剂盒的缺点是它们需要预设病原病因学的相关知识。以 NGS 为基础的对临床标本进行直接测序的宏基因组学工作流程，将会成为改变现有规程的一种手段，该流程可对病原体（已知或先前未鉴定）进行准确鉴定，同时还可适用于具有毒力、抗生素耐药基因或耐药突变的病原体。广泛采用宏基因组学诊断方法的主要障碍是对生物信息学和计算机专业知识的需求。虽然目前已开发了用于从宏基因组学数据中检测病原体的分析工具[130-133]，但是这些平台具有特定的要求，因此，无法在临床实验室中开展实际应用。生物信息学和计算生物学具有高性能计算的特点，并且对用户的专业知识也有一定的要求，这些都是在临床工作时间段内应用这些分析工具的障碍。必须开发适用于临床的分析工具，以增强宏基因组学的效能、增强医学诊断的最大潜力。

六、总结

19 世纪末和 20 世纪初是捕获微生物的时代，这之后人类一直在致力于发现和消灭人类病原体。依赖实验室培养的传统微生物学技术已部分地被核酸扩增和测序等分子方法所取代。微阵列和核酸测序技术的进步促进了许多先前未培养出的病原体的发现。微生物基因组测序已帮助研究者精确地理解各种病原体的分子流行病学，并协助完善了病毒和细菌病原体精细化分层。NGS 方法[72,109]已被应用于临床实验室实时诊断感染，在参考实验室和公共卫生实验室的条件下，这样的应用预计会更迅速地增长[110]。在宏基因组医学时代，快速地获得复杂微生物和病毒基因组和宏基因组数据，从而获得其组成及功能信息，这种能力的加强将持续深刻地加深研究者对发病机制的理解和加快新的诊断方法开发。

参考文献请扫二维码查阅

第二部分　细 菌 学



第二部分　细菌学

第2篇

总　　论

第18章 细菌分类学和细菌分类

PAUL A. LAWSON, KERIN L. TYRRELL

(陈茶、屈平华 译;倪语星 审校)

一、分类学、临床微生物学和医疗健康

要厘清分类学(taxonomy)与医疗健康的关系并不简单;尤其在现代,当测序方法引入后,发现许多原来已建立的分类群被错误分类并需要重新分类时,分类学和医疗健康的关系变得更加复杂。比如,有许多与临床相关的微生物的名字已经在临床领域广泛地使用,但现在却需要重新分类。这一问题最明显的是梭菌属(*Clostridium*)及其邻近菌种,因为它们中的多个菌种与疾病进展相关,故在第55章"梭菌属和拟梭菌属"进行描述。基于16S rRNA基因测序分析,Collins和他的同事揭示了梭菌(clostridia)的巨大多样性,将梭菌分为19个16S rRNA基因簇(clusters),并且,按他们的提议,真正的梭菌属(*Clostridium*)应该只保留给包含模式种丁酸梭菌(*C. butyricum*)和亲缘关系相近菌种的rRNA簇Ⅰ[1]。然而,直到2016年,Lawson和Rainey才正式提出了将梭菌属严格限制为rRNA簇Ⅰ的建议,并将多个物种重新分类为新的菌属和现存的菌属[2]。这些变化的结果是,许多在系统发育上不在rRNA簇Ⅰ的梭菌不被认为是梭菌属的真正成员,因此需要重新分类,并且这一重新分类的进程仍在继续并导致了许多以前的菌种被重新分类;尽管许多菌种并不具有临床重要性,但有些微生物与人类感染有关。一个重要的示例是艰难梭菌(*Clostridium difficile*),它是rRNA簇Ⅺ的成员,在2016年被Lawson和他的同事重新命名为艰难拟梭菌(*Clostridioides difficile*)[3]。虽然艰难拟梭菌并没有在临床领域得到普遍认可,但随着新信息的获得和微生物系统发育的更新,这种将新名称重新分配给先前错误分类微生物的进程将继续下去。因此,分类学可以对医疗卫生行业产生巨大的影响。尽管在临床上常常不被重视,但因为分类学在微生物的有序鉴定和命名中发挥作用,故临床感染的鉴别诊断和治疗方案制定必须以分类学为基础。

(一)微生物系统学和分类学的介绍

自Antonie van Leeuwenhoek最初通过自制的简单显微镜观察到"微小动物(animalcules)"以来,科学家就一直在致力于微生物的鉴定和分类研究[4]。微生物之间的比较生物学即系统学(systematics)成为分类学的基石,且分类方法也在不断提炼和升级。在1882年,Hans Christian Gram发明了革兰染色法,增强了细菌最初的形态学观察;随后,以生化试验(包括碳水化合物的不同利用率)确定的细菌生理特性,成为细菌鉴定的基本方法。化学特性和更现代的方法,如16S rRNA基因测序、多位点序列分析(multilocus sequence analysis, MLSA)及一系列DNA指纹分析等分子生物学方法,则进一步将分类学研究提升到较高的水平。而在最近,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)和全基因组测序(WGS)成为显著增强微生物鉴定和整体分类的可用工具。

对于现代研究者而言,"系统学"和"分类学"是同义词。但是,学者Cowan强烈反对这一论断[5-6],在他看来,系统学是一个更广泛的生物学领域,研究微生物之间的多样性和亲缘关系;相对而言,分类学的定义要窄得多,且可以认为是在系统学框架下的一个内容,包括分类(将微生物有序划分为不同的分类群)、命名(对分类单元标上名称)和鉴定(决定一个新分离株是否属于已定分类

单元的过程)3个部分的内容。鉴于大量未知微生物尚未被科学描述，Staley最近提出“理解微生物多样性”应该是分类学的第4个目标[7]。尽管数字各不相同，但保守估计地球上细菌和古菌物种的数量远远超过100万[8-9]。然而，到目前为止，只有大约1800个物种被有效命名(译者注：原文有误，实际应为18 000种)，且每年以600～700个新物种的速度递增(http://www.bacterio.net/)。以这样的速度，这甚至需要几个世纪的时间才能对这巨大微生物多样性中的一小部分来进行编目。而事实上，当今正处于微生物系统学领域的一个关键节点。现在正在进行一场激烈的辩论：到底应该使用哪种方法进行分类，是该采用传统的多相方法并结合多种方法尽可能全面地描述分类群，还是该使用一种在公布的全基因组序列基础上添加一些实验室特征的更为简约的方法[10-12]。事实上，有人提议基因组序列才是原核生物分类描述的典型材料[13]。

一个强大的分类学必须包含足够多的用于鉴定的生物标志物，且将分类单元分配给特定的类群是一个稳健的过程。分类学的基本目标是构建一个在本质上具有实用性、预测性，以及广泛稳定性的分类法。不可避免的是，随着全基因测序的爆炸性应用，来自这些序列信息的完整记录将被越来越多地用于描述新分类单元和纳入新分类的信息。由于主要分析和发布数据所需的成本和时间减少，许多人现在更喜欢这种“基因组路线”。从基因组中存在的基因去推断出细菌生理特性，而确证生理特征的实践却经常被绕开，从而导致了一种“流水线”分类法的出现。尽管大多数专业分类学家采用的一个统一的主题是，必须包含基因组分析获得的信息(下一代测序已能被实验室负担得起)，但关于需要何种程度的分析及是否以需要牺牲传统分类实践为代价的争论仍在继续。

对于某些人来说，分类学被认为是一门有些过时的学科，深奥且不值得研究。当然，许多人会争论这一点，因为分类学目前正重新受到关注。在临床实验室中，检测、分离和确定感染病原体的种类，并在必要时将此信息传达给医生和更广泛的公共卫生系统至关重要；物种名称对于每个人必须是同一事物。当前，对人体微生物组的研究揭示了人体微生物在健康和疾病过程中的多重作用；显然，随着个性化医疗的商业化和在未来几年的开发，关键微生物和重要微生物的鉴定，将导致微生物在人类健康中的应用增加[14]。尽管微生物组学是人们对抗疾病的一个潜在的重要工具，但是人们对微生物组和现存微生物的理解十分欠缺，且仅60%～80%的序列被归入已知的类群[15-18]。随着公众对“微生物组”的兴趣不断增长，以及实验室中鉴定和培养微生物的一系列新工具的出现，分类学可能会复兴。本章将介绍现代分类学中使用的方法；建议读者可优先阅读本章节引用的主要文献，而不是那些超出本章范围的大量文献综述。关于本章节讨论的方法和资料，来自2本宝贵的教科书，分别是 *Methods in Microbiology* 系列丛书第38卷的 *Taxonomy of Prokaryotes*[19] 和第41卷的 *New Approaches to Prokaryotic Systematics*[20]。

(二)细菌和古菌的分类

Kluyver 和 van Niel 在1936年说过，“唯一的真正科学的分类基础是从系统发育的角度来理解可用的事实：只有这样才能正确理解各种细菌的自然相互关系(natural interrelationships)”[21]

系统学，更具体地说是微生物分类，是一个动态发展的领域，因为微生物的特征会受到理论和方法学发展的影响，这些变化可能从简单的改进到新方法的全面发展，以16S rRNA基因测序的应用为例，它让研究者对微生物多样性的看法发生了革命性的转变[22-24]。在16S rRNA基因测序方法问世后的一个较短的时间里，该方法就成为分类的“金标准”，且在《伯杰手册》系列丛书的名称中可以反映出来。该手册在1923－1994出版了1～9版，其名称为《伯杰细菌学鉴定手册(*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*)》；1984更名为《伯杰系统细菌学手册(*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*)》，以及出版了第1卷并于1989年完成书4卷的出版，新手册第2版于2001年首次出版并于2012年完成全书5卷内容；而最近的在线数字版，更名为《伯杰系统细菌学和古菌学手册(*Bergey's Manual of Systematic Archaea and Bacteria*)》(http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9781118960608)[25]。后来的这些变革是对新分类群描述爆炸式增长而做出的反应，也是为满足对所有命名原核生物提供最新描述的需要而

做出的反应。可靠的分类是微生物研究的先决条件，其目的是将生物体按特征有序地排列成不同组。对分类的全面回顾超出了本文的范围，读者可参考主要文献[26-28]。

广义地说，分类方案可以分为两大类，一大类为分子方法出现之前构建的方案，另一大类为提供了一种系统发育(进化)方法的，即以传统方法为基础的方案或修订方案[26]。早期的分类系统是基于形态学和生化数据，染色方法(如革兰染色法)[29]和利用碳水化合物的能力产生特定的模型(patterns)。这些方法可进行种的鉴定和界定，并构成了许多实验室细菌鉴定的基础[30]。而向前迈出的重要一步(特别是在临床实验室)是引进微型检测试剂盒或表型指纹(phenotypic fingerprinting)，使得一个单一的检测系统可以测定多种生理特性，如碳水化合物和酶实验分析。这些分析与数码鉴定对应，可通过在线数据库进行搜索；但不幸的是，这些数据库往往不能及时更新，故不包含最近描述的微生物信息[31-34]。表型方法的另一个不足之处是，这种方法不能普遍应用于所有细菌和古菌；例如，并非所有微生物在这些检测中都具有代谢活性。因此，微生物的复杂性导致了分类方案和分类数据不能匹配。

这些传统方法的缺陷形成了进化和系统发育应用特征的概念和理论。不幸的是，这些早期构建系统发育关系和基于发育树分类的尝试，主要依赖于细胞形态学[21]。而基于自然系统发育关系的分类直到应用基于核酸的分子方法和包含在其中的进化信息才能实现。1965 年，Zucherkandl 和 Pauling 开创性论文介绍了以氨基酸或核苷酸序列衍生出来的“分子钟”概念[35]。另一个重大成就是，20 世纪 60 年代和 70 年代 Carl Woese、George Fox 和他的同事们建立的寡核苷酸编目法，以及随后的 16S 和 23S rRNA 基因全序列测序[22,36-37]。除序列信息外，细胞的化学成分即化学分类标志物，如细胞脂肪酸、细胞糖、分枝菌酸、极性脂质、多胺、呼吸醌和氨基酸组成，以及胞壁层(murein layer)的二胺酸，被发现是稳定的生物标志物并反映了系统发育关系[38-42]。事实上，这些特征的鉴定仍然包含在对细菌和古菌的正式描述中。然而，许多实验室现在缺乏进行这种分析的技术能力。现在有人认为，由于所涉及的劳动成本、可重复性的缺失，以及精确数据库的缺失，这些化学分类学方法不再是未来描述新种的先决条件[10,43-44]。

二、分类等级

不同的分类等级，构成了有序的分类体系。最高的分类等级是域(domain)，而原核生物包括细菌和古菌 2 个域[45]。从域依次降低的分类等级分别是门、纲、目、科、属、种和亚种(表 18-1)。亚种以下的分类等级有生物变异株(biovars)、生态型(ecotypes)、噬菌体变异株(phagovars)、致病性变异株(pathovars)及血清变异株(serovars)，它们可通过特定特征(如抗原反应、噬菌体分型和 DNA 指纹图谱)加以区分[46-48]。在写作时，具有法定地位的原核生物名称目录(*List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*，LPSN)(http://www.bacterio.net/)已描述的原核生物包含细菌(包括 30 个门)和古菌(5 个门)；总计约 2900 属、18 000 种及 600 种亚种。此外，有 342 株属于“暂定(*Candidatus*)”类别的菌株未被《原核生物国际命名法(*International Code of Nomenclature of Prokaryotes*)》所涵盖[49]。LPSN 和伯杰手册是原核分类学的主要和重要的资源。大多数临床上重要的原核物种包含在变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和放线菌门(*Actinobacteria*)中；其他病原体位于拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、螺旋体门(*Spirochaetes*)及衣原体门(*Chlamydiae*)中[50]。直到最近，人们才意识到古菌成员也具有临床意义；且根据培养和分子研究，它们越来越多地从临床材料中被发现，并可能在疾病的形成中发挥作用[51-53]。

表 18-1　分类阶元

阶元	举例
域(Domain)	细菌域(Bacteria)
门(Phylum)	厚壁菌门(*Firmicutes*)
纲(Class)	梭菌纲(*Clostridia*)
目(Order)	梭菌目(*Clostridiales*)
科(Family)	梭菌科(*Clostridiaceae*)
属(Genus)	梭菌属(*Clostridium*)
种(Species)	酯化梭菌(*Clostridium esthertheticum*)
亚种(Subspecies)	酯化梭菌酯化亚种(*Clostridium estertheticum* subsp. *estertheticum*)

三、种、亚种和模式菌株

“种”是分类学最基本单元，已有大量的文献致力于推动“物种形成事件（speciation events）”和一个明确的种定义的形成[54-58]。20世纪70年代，Colwell提出了一个微生物学家普遍接受的定义，即“种是具有高度整体相似性和与其他亲缘相近菌株有相当差别（具有许多独立特征）的一组菌株”，或者简单地说“一组与其他相关菌株相比具有高度整体相似性的菌株”[59]。需要指出的是，该定义是基于使用了基因型、表型及系统发育信息等多相方法（polyphasic approach）[60]。为了给“物种辩论”带来一些更严格的标准，“重评细菌种定义的特设委员会（Ad Hoc Committee for the Re-evaluation of the Species Definition in Bacteriology）”专家讨论形成共识，强调种的定义应该包含DNA-DNA杂交（DNA-DNA hybridization，DDH）的信息，即“同一菌种通常包括DNA-DNA关联度（DNA-DNA relatedness）≥70%且ΔT_m值≤5 ℃的一组菌株（2个值均需要考虑）”[61]。但遗憾的是，ΔT_m值经常没有执行或没有报告（注：ΔT_m值表示DNA-DNA杂交种的熔化温度，测量的是DNA双链的热稳定性）[62-63]。尽管DDH一直被认为是原核物种界定的“金标准”，但由于16S rRNA基因序列的新种描述中爆炸性发展，16S rRNA基因测序已经成为重要的比较方法。DDH和16S rRNA基因相似性之间的关系已经被研究，之前的许多年将97% 16S rRNA基因相似性等同于70% DDH关联度[64]；且这个16S rRNA基因序列相似性的阈值很快被科学界采用，以减少在实验室进行烦琐的DDH实验的需要。而最近的研究已经将16S rRNA基因相似性界定新菌种的阈值从97%提高到98.2%～99.0%[65-67]。由于做DDH实验所需的时间、错误率和缺乏累积数据库，目前已经在寻找DDH的替代方法[57-68]。由于16S rRNA基因的保守性，其对新类群的分辨能力不足而不能分辨出亲缘关系非常接近的微生物。具有更大分辨率的基因序列，如ATP合成酶（ATP synthase，*atpA*）、DNA促旋酶亚基B（DNA gyrase subunit B，*gyrB*）、RNA聚合酶A亚基（RNA polymerase A subunit，*rpoA*）、RNA聚合酶B亚基（RNA polymerase B subunit，*rpoB*）、RNA聚合酶C亚基（RNA polymerase C subunit，*rpoC*）、苯丙氨酸-tRNA合成酶（phenylalanyl-tRNA synthase，*pheS*）及超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，*sod*）等，已被广泛用作16S rRNA基因的替代时钟（chronometers）[69]。由于单个基因的分子系统发育可以导致差异，但通过应用多个管家基因（housekeeping genes）的MLSA可以减少差异[69-70]。多个基因提供更多的信息核苷酸位点和抵消与使用单基因产物相关的偏差。尽管MLSA被证明是非常有用的，但它并非没有问题，尤其是其缺乏通用的引物和涵盖所有系统发育群的一套标准基因，故基因串联也会产生问题[71]。随着基因组测序技术的迅速发展，MLSA分析的基本方法已经被全基因组测序所替代，而测序应用的扩展和测序成本的大大降低，进而鼓励更多的实验室转向基因组方法[72]。一个前沿的划分类群的方法称为“整体基因组相关性指数（overall genome relatedness indices，OGRI）”，其基于基因组测序数据对原核生物的基因组相关性进行估计。OGRI是一种简单、可重复和客观的比较2个基因组的方法，具体可见Chun和Rainey在2014年的综述[73]。该方法目前有2个可选择的具体方案，一个是数字DDH（digital DDH）或基因组到基因组距离计算器（Genome-to-Genome Distance Calculator；GGDC）[74]，一个是平均核苷酸一致性（average nucleotide identity，ANI）[75]，这2个方案都可以作为网络服务使用（表18-2）。在推荐的物种界定边界中，ANI和转换的数字DDH值为95%～96%，从而与70% DDH关联度界限相对应[74-77]。因此，16S rRNA基因相似性和OGRI的结合，可以作为鉴定和确认一个新物种的系统步骤。在这两步方法中，通过基于16S rRNA基因序列比较获得需要进行基因组比较的物种列表，且仅选择16S rRNA基因相似性≥98.7%的物种来计算OGRIs[65-66, 78]。

表 18-2　微生物分类相关的数据库

	功能	网址
命名和菌株追踪		
当前的原核生物命名(Prokaryotic Nomenclature Up-To-Date)	根据有效公布的《细菌法典(*Bacteriological Code*)》和有效发表的命名变化,汇编所有合格发表的细菌和古菌名称	https://www.dsmz.de/services/online-tools/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date
具有法定地位的原核生物名称目录(List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, LPSN)	按字母顺序和时间顺序,在 *Approved Lists of Bacterial Names* 中引用或在 *International Journal of Systematic Bacteriology* 杂志或 *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 中合格发表的细菌名称和名称变化	http://www.bacterio.net/
微生物多样性		
基因组和系统发育分析		
RDP	16S rRNA 基因数据库	http://rdp.cme.msu.edu/
SILVA	rRNA 基因数据库	http://www.arb-silva.de/
GREENGENES	16S rRNA 基因数据库	http://greengenes.lbl.gov/
肽聚糖结构命名法(Nomenclature of Peptidoglycan Structures)	交联类型 A 和 B 的肽聚糖结构命名(Nomenclature of peptidoglycan structures of cross linkage types A and B)	http://www.peptidoglycan-types.info
BIGSdb	细菌分离株的基因组序列数据库	http://pubmlst.org/software/database/bigsdb/
EMBL-EBI	分子生物学、宏基因组学和核苷酸序列库的程序合集	https://www.ebi.ac.uk/
NCBI	生物医学和基因组信息的程序合集	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
IMG	微生物基因组和宏基因组注释与分析的广阔平台	https://img.jgi.doe.gov/
GGDC	计算平均核苷酸一致性	http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php/(注:此链接为译者补充)
ANI 计算器	计算平均核苷酸一致性	http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/(注:此链接为译者补充)
ANI 计算器	计算平均核苷酸一致性	https://www.ezbiocloud.net/tools/ani/(注:此链接为译者补充)
JSpeciesWS	计算平均核苷酸一致性	http://jspecies.ribohost.com/
ContEst16S	检查基因组污染	https://www.ezbiocloud.net/tools/contest16s/(注:此链接为译者补充)
CheckM	检查基因组污染	https://omictools.com/checkm-tool/(注:此链接为译者补充)
BBMap	测序覆盖层深度的计算	https://sourceforge.net/projects/bbmap/
BCG54	系统发育组学研究	http://www.ezbiocloud.net/tools/bcg54/
Amphora2	系统发育组学研究	http://wolbachia.biology.virginia.edu/WuLab/Software.html
Phylophlan	系统发育组学研究	https://huttenhower.sph.harvard.edu/phylophlan
转运和代谢功能		
京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)		http://www.genome.jp/kegg/

（续 表）

	功能	网址
TCDB	转运分类数据库	http://www.tcdb.org/
MetaCyc	代谢途径数据库	http://metacyc.ai.sri.com/（译者注：此链接为译者补充）
TransportDB	转运蛋白分析数据库	http://www.membranetransport.org/
蛋白质家族		
CDD	保守域数据库	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/
pfam	蛋白质家族数据库	http://pfam.xfam.org/
致病性		
TBDB	结核病整合平台	http://genome.tbdb.org/tbdb_sysbio/MultiHome.html
PATRIC	许多原核生物的门户网站	https://www.patricbrc.org/

无论用什么方法来描述一个菌种，都会指定一个“命名模型（nomenclatural type）”或“模式菌种（type species）”[译者注：从上下文来看，此处为模式菌株（type strain）]，并以纯培养方式保存；它是种名的参考样本，代表了表型和基因型变异[79]。然而，在实践中，模式菌种[译者注：从上下文来看，此处为模式菌株（type strain）]往往是第一个被分离和特征化描述的菌株。Sneath 在 1977 年的计算认为，一个菌种描述中应该包含 25 个菌株，以完全包括具有代表性的表型和化学分类特性[80]。后来出现的一个复杂的问题在于 16S rRNA 基因测序的应用，使得自 20 世纪 80 年代以来对新分类类群的描述大大增加，并导致许多属和种被限制在一个单一的菌株上。当然，单一菌株不能包含同一个菌种内存在的生理、代谢和基因型变异[81]。这些单一菌株的描述的新菌种中有许多来自临床和兽医来源的微生物，但分离额外菌株的尝试并不成功[82]。这种分离多个菌株的困难导致了一个两难境地：作者是应该以单一菌株为基础发表新种文章，还是应该在发现多个菌株之后再进行分类实践。有人可能认为，通过分子方法描述的单一菌株的发表，可以发现和收集在其他机构随机发现的其他菌株，从而进一步描述生理和代谢变异。科学界正被鼓励对分离的微生物进行分类，从而缩小已合格命名的分类群物和“尚未被培养的微生物群”之间的巨大差距[10, 44]。在查阅文献时发现，许多在 20 世纪 80 年代和 90 年代就已经描述的单一菌株分类群，至今仍然没有分离到其他来源的菌株。此外，*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 期刊中，有超过 80%的论文是基于单一菌株。如果这些资料没有被发表，名字也没有被合法化，那么大量的微生物多样性将从文献中消失，且其中的许多种微生物后来被发现具有临床意义[83-84]。

四、未培养微生物

术语“非可培养微生物（uncultivatable organisms）”或“非能培养微生物（unculturable organisms）”指的是不能在人工培养基上生长和维持纯培养的微生物。但因为所有微生物在适合的条件下都是可以培养的，所以更正式的术语应该是“暂未培养微生物（not yet cultivated organisms）”。面临的挑战和需要解决的困难是，该如何寻找合适的营养浓度和营养条件来生长和分离这些苛刻的微生物[85]。1985 年，Staley 和 Konopka 观察到显微镜下计数的数量与培养的活菌数量之间存在大的差异[86]，这一观测结果被称为大平板计数异常（great plate count anomaly），且被分子方法证实[87-88]，如，利用 16S rRNA 基因测序发现了大量与培养菌株数量不符的新的系统发育类型[15, 89-90]。并且，在过去的 20 年里，基于 16S rRNA 基因测序的分子图谱显示，仍有大量的细菌和古菌有待描述，故培养方法的不足导致了“微生物暗物质（microbial dark matter）”一词的出现[91]。有证据表明，只有 0.1%～1.0%的环境来源分类群在实验室培养过[8-9]。尽管在动物和人

类的微生物中的数字还算令人鼓舞，但培养的生物与未培养的生物比例的变化巨大（取决于所使用的方法）。Lagkouvardos 及其同事回顾了相关文献，认为人类和小鼠的微生物群中有 35%～65%的比例已经被培养[18]。Didier Raoult 和他的同事们在人类胃肠道生物分离方面做出了巨大的努力，他们通过将培养方法与 MALDI-TOF 质谱的快速筛选相结合，创造了“培养组学（Culturomics）”的新方法，并培养出了大量新的微生物[92-95]。一般来说，培养策略主要集中在 3 个概念上：①提炼标准培养策略[96-100]；②模拟自然环境[101-105]；③培养微生物群落[106-109]。尽管目标是分离纯培养的微生物，但由于密切的共生、互惠和同营养的相互作用，对于某些（或许多）微生物来说，可能无法分离到纯培养[110-114]。因此，某些培养研究可能最终导致分离出微生物联合体（microbial consortia），其中单个微生物不可能被分离，需要用基因组的工具来鉴定和描述联合体的成员。

五、命名法

对于许多微生物学家来说，命名法可能是分类学中最具挑战性的组成部分，而分类学并不是他们关注的主要焦点。由于没有正式或官方的分类系统，也没有一个用于描述菌株特征的明确方法列表，因此命名法可能受到一系列看似压倒性规则的支配。这些规则最初在 1990 年制定，并由国际系统细菌学委员会（International Committee on Systematic Bacteriology）以文件的形式批准和颁布，即《国际细菌命名法典（*International Code of Nomenclature of Bacteria*）》[简称《细菌法典（*The Bacteriological Code*）》][115]，该文件最近更新为《国际原核生物命名法典（*International Code of Nomenclature of Prokaryotes*）》[简称《原核生物法典（*The Prokaryotic Code*）》][49]。在 1980 之前，一个新的分类单元的提出可以在任何微生物期刊或书中发表；这种灵活性导致两大问题：①模式菌株丢失，或不能被其他科学领域获得，从而导致不能与新分离的菌株进行比较；②同一种微生物经常被不同的作者描述为不同的名字，从而导致了同物异名（synonyms）现象发生。为了解决这样那样的问题，1980 年，国际系统细菌学裁决委员会（Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology）出版了《核准的细菌名称目录（*Approved List of Bacterial Names*）》[116-117]。该目录只包括那些在细菌命名法中具有法定地位的、已经被充分描述的和有指定模式菌株的名字；简单来说，这个“合格化（validation）”过程代表了对 1980 年 1 月 1 日前发表的所有细菌名称进行正式注册和建立目录，并包含在《核准的细菌名称目录（*Approved List of Bacterial Names*）》中；而在该目录上有名字的微生物，可作为分类目的合格发表（validly published），且“合格”的时间为 1980 年 1 月 1 日。此后，所有的新菌名都应该“合格”发表在 IJSEM（http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem），如在其他杂志上有效发表（effectively published），则在合格化目录（Validation Lists）出版前必须提供给 IJSEM 杂志进行审查[118]。在“合格化”的过程中，IJSEM 杂志会要求将模式菌株同时保存到 2 个公共的培养物保藏中心[119]，且这些保藏中心是世界培养物保藏联盟（World Federation of Culture Collections，网址 www.wfcc.info）的成员。这样的保藏工作（包括将微生物菌株保存和分发给微生物学家）是无价的，包括学院、工业和生物技术领域在内的微生物学家，均可以对菌株进行进一步的研究[80,120]。这一程序确保合格发表的原核生物种、属、科和目的数量，在任何时候都是已知的。同时，该信息也可通过在线的 LPSN 获取，如前所述，LPSN 是科学界非常重要的资源[121-122]。由于历史的原因，《国际原核生物命名法典》只涵盖了纲的阶元，而没有包括门的阶元。后果是，那些纲以上的细菌名称没有得到规范，故一些被提出的名称实际是不正确的[123]。目前已有关于在《国际原核生物命名法典》中涵盖门的提案，但有待于国际原核生物系统学委员会的进一步讨论[124]。

如果需要全面了解细菌命名法，鼓励读者阅读 Peter Sneath 的论文[79]。细菌的命名，即微生物的实际命名，是基于瑞典植物学家 Carolus Linnaeus 建立的双命名系统（由属名和种名组成）[125]。词源学（词的起源和历史发展）是命名的重要部分，用来解释现有名称，并允许形成新名称。原核生物的命名指定使用拉丁文或希腊文，属名用大写，种名用小写，且均用斜体，如

Escherichia coli。描述原核生物名称的词源超出了本章的范围，不过，读者可以参考一些好的参考文献，这些文献提供了如何命名微生物的有用信息[126-127]。

如前所述，绝大多数微生物还没有分离到纯培养和被正式描述。如果能分离到纯培养菌株，则在基因序列的基础上，还应该进行形态学、革兰染色、生境或来源、生理（厌氧或需氧、电子受体或供体、生长温度）等特征的检测。而对于目前不可培养的菌株，则只能获得序列信息（如16S rRNA基因序列和全基因组）。尽管可以从宏基因组信息中进行基因挖掘并得到微生物的生理、代谢或功能特性的推断，但无法满足国际原核生物分类委员会规定的对新物种进行生理特性描述的要求。对于通过16S rRNA基因测序的非培养方法揭示的新分类群的巨大多样性（包括多个深层系统发育谱系），提议对推定的分类单元以暂时的分类地位即"暂定（Candidatus）"阶元进行分类[128-129]，但不能采用国际原核生物分类委员会正式规则和条款进行描述和命名[49]。此外，国际原核生物分类委员会不对暂定分类进行命名，因此，作者公布的名称既不能合格发表，也没有优先权，在文献中没有任何地位。目前，科、目和纲等级的暂定分类在文献中日益增多。Konstantinidis等在2017年提出了新的基于基因组的分类标准，以解决尚未培养的微生物的分类问题[130]。对此，Oren和Garrity则在2017年强烈建议不要使用单独的分类法，因此这可能会导致很多混乱[123]。然而，也许有一种能让双方都满意的解决方案：William Whitman作为分类学中使用基因组序列的有力倡导者[13, 131]，最近提出扩大原核生物命名的模式材料的议案[132]，该议案将已培养和尚未培养的原核生物的命名统一到同一个系统。正如Oren和Garrity在2017年所表达的那样，这一过程将是复杂的，需要在国际原核生物分类委员会进行修改，目前正等待国际原核生物分类委员会裁决委员会的初步讨论，以及进一步的全体委员会议，从而形成正式的章程[123]。如果该议案通过，对于提议"暂定"分类在命名上缺乏监督的问题将会得到解决。显然，这里面的许多名称都存在问题，且需要更正[133]。

六、分类、特征和鉴定

分类是鉴定的先决条件，因为分类确定一个分离菌株是属于一个已建立的分类单元，还是属于既往的、未鉴定的物种的一员；对于既往未鉴定的新菌种，需要根据国际原核生物命名法管理的命名规则来进行命名和描述[49]。菌株的特征分析是原核生物系统学的一个关键要素。目前，各种新技术作为"传统"方法的补充，已经被开发和纳入到菌株的特征分析中，以便尽可能全面地描述一个或多个菌株。分子工具的出现，特别是16S rRNA基因测序的出现，测序成本的降低，以及商业"测序中心"的建立，为微生物学家打开了系统学领域的大门，其在专门研究和临床实验室中的应用已经超出了生物技术、制药工业和医学领域的范围。对于非专业分类学家来说，对一个被鉴定出来的新菌株（通常是通过16S rRNA基因测序）进行特征分析、描述并确保该微生物正确命名和合格发表的过程，是一个巨大的挑战。文献中充斥着"有效发表（effectively published）"但未"合格发表（validly published）"的新细菌；其结果要么是没有提交给IJSEM杂志完成这一"合格化"过程，要么是由于出版物本身的缺陷而被拒绝命名的名称（例如，未能将菌株提交到2个不同的培养物保藏中心。幸运的是，现在已有许多刊登和出版微生物新种论文的优秀的期刊，它们由分类学家领航，涵盖了新微生物特征描述的测试选择、新微生物的命名和发表等内容[127, 134-137]。

（一）分类学的多相方法

尽管对于描述一个新分类单元究竟需要多少信息存在着一些有益的争论[10, 12]，多相分类法目前是大多数作者选择的方法[27, 138]。Colwell在1970年首先创造了"多相分类法"一词来描述一种尽可能多地包含信息的分类法（包括从表型到基因型的所有信息）[60]。Vandamme及其同事在1996年进一步完善了多相分类法，包括所有可用于系统发育分类的方法[27]。基因型信息来源于核酸（DNA和RNA），而表型信息来源于蛋白质及其功能、化学分类标志物和其他广泛的表达特征。在现代，微生物学家可以快速确定一个分离物的16S rRNA基因序列，随后的数据库搜索可揭示该

分离菌株最近的系统发育亲缘关系。然后，对相关微生物进行文献检索，以便选择合适的表型试验以进行全面的特征分析，从而将菌株鉴定到已有的种或者是新种，且如果是新种，则应该对该新种(或新属新种)进行描述[134-135]。有文献对多相方法进行了广泛的综述[27,138]。本手册的其他章节侧重于具体方法，以下各节概述了一些更常用的分类研究方法。

(二)表型方法

在历史上，表型分析如形态学、生理学和生物化学是微生物鉴定的核心。然而，表型试验需要高度标准化的程序来获得可重复的结果，特别当这些结果要与不同实验室的数据兼容时[30]。计算机的早期发展允许大量的表型试验和菌株进行比较；这些计算机生成的生化图谱详细说明了菌株之间的相似程度[139]。一定数量的共同特征被认为是分类学上亲缘关系的一种定量检测指标，但由于缺乏标准方法，特别是当所用数据取自文献而不是与参考菌株平行确定时，其方法的准确性会大打折扣。表型方法不能像16S rRNA基因测序一样，可广泛应用于所有分类群；因为对于某些特定的细菌类群而言，其表型特征的缺乏和表型特征的可变异性，或鉴定有鉴别意义的表型特征存在问题，经常导致描述或区分分类群时出现问题。并且，分子方法的兴起和应用进一步凸显了数值分类法的不足，因为这些分子生物学方法不会受到严格标准化生长要求的束缚。

尽管数值分类鉴定的表型方法在很大程度上也不用于新种的分类，但生化、营养条件和生理标准的检测是系统学的一个基本组成部分，在发表新分类时需要对上述表型特征进行例行的种的描述[140]。在某种程度上，商业化微型生化试剂盒如API系统和Biolog的引入，大大提高了鉴定速度[31-32,34,141]。此外，基因组序列可用来检查这些检测系统中存在的代谢途径和酶类。这种计算机模拟方法使用的基因组规模上的代谢网络重建，已经应用于产酶试验和碳水化合物利用试验的检测(这些生化试验通常在诊断实验室中使用)；但在未来，基因组方法可能被证明是另一种可供选择的方法[142-145]。

(三)化学分类学

“化学分类学”是指应用分析方法收集各种菌体成分的信息，以帮助原核生物的鉴定和分类[38,146-147]。化学分类标志物是表型的一个重要部分，但通常单独讨论。这些方法已经得到了广泛的应用，尽管单一的方法通常对一群独特微生物群不起作用。这些标志物包括全细胞蛋白质谱、类异戊二烯醌、细胞色素、肽聚糖、多胺、极性脂、色素、特殊酶类、甾醇及藿烷类(hopanoids)[38]。这些特性反映了系统发育关系，目前已被广泛应用并被推荐用于多相分类研究[39]。但值得注意的是，这些化学成分在不同的微生物中可能相同；因此，谨慎的做法是依靠化学分类的差异将微生物从分类单元中排除，而不是使用相似性作为唯一的包含标准。目前，细胞脂肪酸[148]、肽聚糖类型[149]、极性脂[150]及呼吸醌[151]在描述新原核生物分类的出版物中被推荐使用[135]。

1. 细胞脂肪酸分析 在所有的化学分类学特征中，细胞脂肪酸谱的测定是一种可与分子方法相媲美的具有高通量能力的方法。并且，新分类群的描述不包括脂肪酸分布信息的情况很少出现。细胞脂肪酸分析广泛应用得益于商品化MIDI微生物鉴定系统(Microbical ID Inc.，Newark，DE；http://www.MIDI-Inc.com)的引入。脂肪酸的提取、色谱分离和数据分析的步骤相对简单且高度自动化，且允许对大量菌株进行比较和聚类分析。然而，最终用户应注意2个问题：①菌株在高度标准化条件下的生长对于获得真正的比较数据很重要；②不同分类群之间的分辨率(resolution of discrimination)需要仔细检查。因为对于一些属和种而言，细胞脂肪酸谱是非常强大的分化工具；但对于某些类群而言，它们的细胞脂肪酸谱相同或非常相似，这使得该方法作为分类工具的用处降低。鉴于细胞脂肪酸及其在分类学中的应用已经被广泛地综述[38,148,152]，本文只概述了一些有用的信息但不作深入的讨论。脂肪酸主要存在于胞质膜中，是革兰阴性菌外膜层磷脂和脂多糖的组成成分，也是革兰阳性菌膜磷壁酸的组成成分。细菌有各种各样的脂肪酰链成分(迄今已鉴定超过300种)，最常见的产物包括直链饱和脂肪酸、直链不饱和脂肪酸、异支脂肪酸、前异支脂肪酸、内支脂肪酸、羟基脂肪酸、环丙烷脂肪酸、ω-环脂肪酸和二羧酸脂肪酸等。普遍趋势已经被确定，一些脂肪酸在大的细菌群，如α-变形菌门、β-变形菌门及γ-变形菌门中很常见。例如，α-变形

菌门具有共同的 C18∶1(十八碳烯酸)，而黄杆菌属-噬胞菌属-拟杆菌属(*Flavobacterium-Cytophaga-Bacteroides*)成员含有高水平的异型和(或)前异型的支链脂肪酸[153]。细菌和古菌之间细胞脂肪酸有重要的区别。在细菌的细胞膜中，磷脂中的脂肪酸通过酯键与甘油相连并形成磷脂双层，而古菌生物膜磷脂含有 2 个极性头部，通过类异戊二烯链和醚键与甘油相连，称为脂肪醚脂质(fatty ether lipids)[154-156]。古菌不像大多数原核生物那样具有线性碳链，而是在每 4 个碳原子处分枝(分枝处的碳原子以一个甲基链接)。因此，这些重要的差异是检测古菌基因组和寻找脂质代谢生物合成途径的标志[157]。

2. 细胞壁成分 革兰染色是需要首先确定的细菌特征之一，以指导后续的表征和鉴定步骤。然而，这个简单的测试低估了革兰阴性菌和革兰阳性菌的超微结构差异。革兰阴性菌的细胞壁较薄且层次分明，外膜主要由脂多糖、磷脂、蛋白质、脂蛋白及相对较少的肽聚糖组成(其肽聚糖含量通常不到细胞壁的 10%)。相比之下，革兰阳性菌含有肽聚糖、多糖或磷壁酸(或两者兼有)，或以糖醛酸磷壁酸作为主要成分，但肽聚糖含量通常占细胞壁的 30%以上。肽聚糖是由 *N*-乙酰葡糖胺(*N*-acetylglucosamine)和 *N*-乙酰胞壁酸(*N*-acetylmuramic acid)的交替单元组成的多糖链组成的杂多聚物，这些单元通过短肽交联并以 b-1,4-糖苷键连接。目前，肽聚糖类型已经在分类学广泛应用，且主要是在革兰阳性菌分类中。革兰阴性菌细胞壁的肽聚糖类型相当均匀，能提供的分类信息很少；相反，革兰阳性菌的肽聚糖类型可能具有属或种特异性[158]。最有价值的肽聚糖信息来自聚合物网络中相邻链之间交联肽的类型和组成。目前，根据肽聚糖的交连方式，将其分为 2 种主要类型，即 A 型和 B 型。在 A 型中，可直接将位置 3 处的二氨基的 ω-氨基与位置 4 处相邻肽亚单位 d-丙氨酸的羧基连接，或通过由 1～7 个氨基酸残基组成的肽间桥完成位置 3 和 4 处的交联。而对于 B 型细胞壁，d-谷氨酸或位置 2 的 Hyg 参与了交联。最重要的分类信息来自肽交联的类型和组成；已有超过 100 种结构类型被鉴定(www.peptinoglycantypes.info)。最简单的分析是测定位于肽干位置 3 的特征性二氨基酸，包括中位二氨基庚二酸和(或)LL-二氨基庚二酸、L-鸟氨酸、L-赖氨酸和 L-二氨基丁酸。目前，除了对整个肽聚糖进行全面分析之外，在物种描述中越来越多地报告了这些诊断性二氨基酸[135,159]。

3. 极性脂类 极性脂类存在于所有原核生物的细胞膜中，具有多种多样的结构。鉴于存在巨大的多样性，大多数期刊和审稿专家仍然需要作者提供二维薄层色谱(two-dimensional thin-layer chromatography, 2DTLC)显影来记录存在的脂质(注：该显影需用一种试剂染色，从而使所有脂质可见)[135]。从这些图像中可以明显看出，许多脂类仍有待鉴定，如通过核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)和质谱(mass spectrometry, MS)研究继续鉴定这些脂类的结构[150,160-161]。古菌也具有广泛多样性的极性脂类，包括磷脂、糖脂、磷糖脂、硫脂及氨基脂类等[156,162]。不同极性头部基团(polar head groups)可出现于不同古菌科细菌，故可作为独特的分类标志物[163]。例如，氨基脂类在产甲烷菌中普遍存在，但在嗜盐菌和嗜热菌中完全不存在[164]。

4. 呼吸醌 类异戊二烯醌(isoprenoid quinones)被发现是细菌和古菌中大多数需氧或厌氧微生物中原核生物细胞膜的成分，它们在电子传递中起着重要作用[165-167]。大多数类异戊二烯醌可分为 2 种不同的基本结构类别，即萘醌类(naphthoquinones)和苯醌类(benzoquinones)，第 3 类是基于苯并噻吩衍生物(benzothiophene derivatives)的更严格结构。苯醌类包括泛醌(ubiquinones)、罗丹醌(rhodoquinones)和质体醌(plastoquinones)。除了不同的醌类型外，聚戊烯基侧链的长度和饱和程度在分类中也有重要价值[40]。泛醌似乎仅限于 α-变形菌门(Q-10、Q-9 或 Q-11)、γ-变形菌门(Q-8)和 β-变形菌门(Q-7 至 Q-14)[166]。兼性厌氧革兰阴性菌中还含有甲基萘醌(menaquinones)和(或)去甲基甲萘醌(demethylmenaquinones)。需氧和兼性厌氧革兰阳性菌只产生甲基萘醌。严格意义上的厌氧菌缺乏类异戊二烯醌或只含有甲基萘醌[71,148,167]。关于醌结构类型分布的知识仍然是零碎的(特别是在古菌中)。对于广古菌门(*Euryarchaeota*)、泉古菌门(*Crenarchaeota*)和奇古菌门(*Thaumarchaeota*)等古菌的检测，有助于它们作为生态进化枝的化学分类学标志物。形成烷基链的六个异戊二烯基

的饱和和单不饱和甲基萘醌可作为奇古菌门的化学分类学标志物。其他诊断性生物标志物，如含噻吩的醌类化合物作为硫化叶菌目（*Sulfolobales*）的标志物，以及甲烷吩嗪（methanophenazines）作为甲烷八叠球菌目（*Methanosarcinales*）功能性醌类化合物。与细菌相比，在古菌中普遍存在的饱和甲基萘醌表明，这些化合物可能代表了古菌的祖先特征和诊断特征[168]。

化学分类学方法由于某些缺点而受到批评。最重要的是，核苷酸数据库中有可供直接搜索和比较的参考菌株序列；但是，化学分类学特性数据库不可用于直接搜索。尽管这些方法本身并不困难，但缺乏具有专业知识的人员，许多实验室不再执行这些方法，因此，化学分类学仅限于专业实验室或研究中心[169]。也就是说，只是许多期刊编辑和审稿人继续坚持将这些成分纳入分类描述中；但目前正在协同努力，通过所谓的硅电子分析（in silico analyses）（译者注：所谓硅电子分析，即运用计算机的生物信息分析）从微生物基因组中提取必要的信息[10, 142, 170]。

(四)基因型方法

基因型信息来源于核酸（DNA 和 RNA）；这些方法的应用为微生物学家提供了一些最强大的工具。

1. G+C 含量 最早使用的基因型分类方法之一是测定总 DNA 中鸟嘌呤和胞嘧啶核苷（G+C mol%）比例[171-172]。这是描述细菌类群的一个标准要求。然而，2 个菌株之间有相似的 G+C 值并不意味着它们有密切的亲缘关系；实际上，这是一种被用来区分不相关分类群的方法。一般来说，在同一个菌种的不同菌株中观察到的 G+C 含量范围不应超过 3%；而在一个属的不同种之间，不应超过 10%。尽管传统上采用了一系列的方法（浮密度离心法、热变性法、高效液相色谱法和荧光法测定熔融温度），但在不同方法之间和实验室之间发现了精度问题。此外，与 WGS 预测的 G+C 值相比，其范围为 1.2%～2.0%，有时更高。在现代，人们越来越多地使用 WGS 来确定 G+C mol%值，这已被科学界所接受，并经常被纳入新分类群的描述中[173]。

2. 16S rRNA 测序研究 16S rRNA 基因测序被许多人认为是微生物分类学上最伟大的革命和基于系统发育的分类方法[50]。不同于许多生物标志物，rRNA 存在于所有细菌和古菌中，它是功能的恒量。它由高度保守的区域（用来比对序列）和更多的可变域（用于比较类群之间的差异）组成[22-23]。曾经，只有省级的专业研究实验室才用这种方法，而现在却能被临床检验室常规使用[174-176]。这是由自动化商业鉴定系统（如 MicroSeq 500 16S rDNA 细菌测序试剂盒；珀金埃尔默应用生物系统）和可访问的在线搜索序列数据库（表 18-2）的引进所促成。16S rRNA 基因相似度现在经常被用来定义分类等级：生物体的基因相似度低于 98.7%时，就被认为是不同种，低于 94%的值表明是新的属，并且可以用相似度值低于 89%来推断科的水平地位[177]。这些只是一般情况的参考。一些已知的物种表现出更高水平的 16S rRNA 基因相似度；在肠球菌属中发现了一个示例，其相似值约为 99.5%却是几个不同种（见第 24 章）。基于序列信息的物种划分应该得到其他分类相关信息的支持[24,177-179]。

3. DNA-DNA 杂交研究 DNA-DNA 杂交仍然作为参考方法，用于建立种内和种间亲缘关系。然而，正如上述所讨论，由于该种方法操作烦琐且存在技术困难，现已日益被计算机基因组分析所替代。

4. 全基因组测序方法 16S rRNA 基因序列分析技术的应用预示着微生物分类学革命的到来，而毫无疑问，全基因组测序将在微生物系统学中发挥巨大的作用。在过去的 20 年里，测序技术取得了巨大的进步，推动了低成本基因组测序的发展，而其应用范围已经远远超出“专业测序中心”这个领域[72]。与测序方法涉及的化学基础和硬件设备等同重要的是，能够处理大量信息或“大数据”的能力，以及借助在线数据通道进行更广范围访问和更快速计算的能力[180-181]。基因组测序可以实现 3 个目标：第一，基因组提供了前面所述的对原核生物系统学（系统发育基因组学）的深层解析，且 ANI 和数字 DDH[基因组间距离计算器（GGDC）]等全基因组亲缘关系指数（overall genome related index，OGRI）的应用，能提供的实验数据比传统的实验室确定的 DDH 值更为快速和更为可靠。第二，尽管 OGRI 不适用于系统发育的推断（尤其是在属上级别系统发育的推断），但完整的基因组能提供更深入的生理学和生态学

信息，以及进行关键功能如耐药性的蛋白编码基因和其他致病性因子的鉴定。目前已开发了许多软件工具，可用于明确特定功能鉴定（表 18-2）。第三，核心基因组和基因水平转移的信息（其导致了泛基因组的可塑性），将有利于更好地理解物种形成的进化过程，以及理解跨菌株的保守特性。这些方法还被用于新生物合成途径的探索，新治疗策略和药理活性新化合物的开发中的生物勘探等[182]。目前正在实现基于基因组的系统分类学的应用，并有望推动原核生物分类的再一次革命。

5. 蛋白质编码基因序列分析 目前已经证明 16S rRNA 基因测序是构建系统发育关系强有力的工具，然而其缺点在于不能有效区分亲缘关系相近的物种。蛋白质编码基因的序列分析作为 16S rRNA 基因序列分析的替代方法，目前已在细菌和古菌中探索了许多单拷贝、直系同源、普遍存在的管家基因，以期挖掘它们作为"分子钟"的潜能，以及反映生物演化史的计时作用[69]。常用的基因包括 DNA 促旋酶 B 亚基基因（DNA gyrase subunit B genes, *gyrB*）[183]、RNA 聚合酶 A 亚基基因（RNA polymerase A subunit, *rpoA*）[184]、RNA 聚合酶 B 亚基基因（RNA polymerase B subunit, *rpoB*）[185]、RNA 聚合酶 C 亚基基因（RNA polymerase C subunit, *rpoC*）[186]、苯丙氨酰-tRNA 合成酶基因（phenylalanyl-tRNA synthase, *pheS*）[184]，以及 ATP 合成酶 α 亚基基因（alpha subunit of ATP synthase, *atpA*）[187]。这些基因已被用于单独的标志物，或在多位点序列分析（multilocus sequence analysis, MLSA）技术中用于规避因单一系统发育标志物而可能存在的潜在风险[69,188-189]。

6. 其他用于细菌分类的基因型方法 许多分子诊断方法已经被发展用于不同的分类水平上微生物描述。已开发出鉴别同一菌种不同菌株的方法。这对于可能导致传染病暴发的菌株的流行病学分析或确定食源性病原体的来源尤其重要。大多数是基于 PCR 的方法，其产生 DNA 片段通过电泳分离，并由用于模式识别分析（pattern recognition analysis）和数据库构建的计算机软件进行分析[190-194]。16S-23S rRNA 基因间隔区的测序信息表明，不同菌种之间 16S-23S rRNA 基因间隔区的基因片段长度和序列都可能发生相当大的变化，该特性可开发用于分型和鉴定[195]。其他基因型分析方法包括脉冲场凝胶电泳（pulsed-field gel electrophoresis）和基于稀有限制性内切酶对基因组 DNA 消化的限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism）。扩增片段长度多态性（amplified fragment length polymorphisms, AFLP）基于这个模型建立起来（译者注：即 AFLP 也是基于稀有限制性内切酶对基因组 DNA 进行消化的模型而建立的），而 PCR 用于扩增酶切片段中的亚群。另一套方法是基于对散布在微生物基因组中的重复 DNA 区域进行测序。Rademaker 回顾了这些方法，包括对以下区域进行测序：肠道细菌重复基因一致性（enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC）、重复外源基因回文性（repetitive extragenic palindromic, REP）和肺炎链球菌的 BOX 元件（BOX element）[193]。尽管这些方法被证明是非常有用的，但分析中的困难可能来自对大量生成片段和（或）当一些片段大小范围相似时的解释。然而，当整个基因组序列信息均能被确定，而不是选择有区别对待的 DNA 片段时，再看看这些方法是否能在基因组革命中幸存下来将是一件有趣的事情。因为随着基因组测序成本的不断降低，很可能可对大量菌株进行并行测序，并将其纳入菌株的分类研究和流行病学追踪中。

获得基因组序列还导致了基于其他分子标志物的鉴定。其中一个分子标志物，被称为保守特征插入缺失（conserved signature indels, CSIs）的标志物被 Gupta 和同事开创用于广泛的系统进化谱系[196-197]。CSIs 被定义为蛋白质序列比对中的一个区域，其一级结构观察到特定的变化存在于一个或多个分类群的所有成员中，但不存在于其他分类群中。基因或蛋白质序列的变化可以是特定氨基酸替换的存在，也可以是特定的缺失或插入。许多 CSIs 已经被鉴定为许多不同细菌类群的成员，并且与那些基于单个基因或蛋白质的进化关系相比较能解决更深分支进化关系[70,197-200]。不同的分类学等级现在可以根据多种独特的共享特征，用明确的分子术语清楚地划分。基于这些 CSIs 的推断与基于系统发育方法的推断非常一致，但是进化分支点的优势被更清楚地揭示出来。目前，CSIs 已被应用于门、目、科、属甚至种的划分[197]。

(五)实验室里的变化之风

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

正如16S rRNA基因测序革新了分类和鉴定方法一样,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry,MALDI-TOF MS)也有望做到这一点。有关此方法更详细的文献综述见本书第5章。

MALDI-TOF MS是一种功能强大的工具,可用于种、亚种甚至菌株水平的鉴定和分类[201-202]。最初,Krader和Emerson[203]将MALDI-TOF MS应用于古菌鉴定,但现在已经成为临床实验室中常规使用方法[202]。该方法取决于解析数据生成原因的相关数据分析工具,且其中一个重要的组成部分是与商业软件包一起提供的数据库(该数据库允许通过使用特征指纹图谱形成树状图并进行聚类分析)。虽然大多数病原体在这些数据库中都有很好代表性的质谱数据,但其他微生物,尤其是非临床和环境的菌株则没有包含在数据库中。但对于一些专业的用户群体,这个问题可以通过终端用户构建本地数据库来解决,用户可以在该数据库填充感兴趣的类群的参考菌株质谱数据。但向更广泛的科学界共享使用这些私有数据库仍是目前面临的难题。

由于MALDI-TOF MS的靶标主要是保守的核糖体蛋白,因此,有人提出该方法可能能够用于推断系统发育关系。在得到了惊人的广泛应用的同时,MALDI-TOF MS鉴定的分辨率也逐渐提高,使其成为分类学研究的强大工具。尽管该方法不适用于定义亲缘关系较远的属及更高分类学等级之间的关系,但它提供了与16S rRNA基因序列分析相比更具有价值的基因内关系信息。此外,在研究者看来,MALDI-TOF MS在对具有遗传差异的亚种的鉴定是成熟可信的,但在菌株水平的鉴定上略显不足[201-202,204]。随着培养基和培养条件更加严格的标准化,加上生物信息学的发展克服了质谱不能区分的细微差别,菌株水平分辨率的局限性可以得到解决。由于MALDI-TOF MS的鉴定是以分钟为时间单位进行的(而其他方法则需数小时或数天),且无须购买多种培养基配方和市售的鉴定试剂盒而使用检测成本的大幅降低,这些优势使得采用MALDI-TOF MS进行鉴定对于实验室管理人员来说极具吸引力。相信在不断的改进和完善中,MALDI-TOF MS预计在未来10年内将成为临床实验室中必不可少的选择方法。事实上,这项技术的影响如此之大,以至于许多欧洲实验室采用的鉴定方法几乎完全一致地转向了这种诊断工具。

七、分类学的变迁:基因组学和生物信息学的时代

许多方法的改进正在继续对分类和鉴定方法产生深远的影响,其中主要是WGS和MALDI-TOF MS。但如果不改进计算机硬件和软件,就不可能发挥这些方法的潜能。生物信息学是一个跨学科领域,开发了用于解析生物学数据的方法和软件工具。该领域的领先期刊《生物信息学》专注于基因组生物信息学和计算领域的新进展(https://academic.oup.com/bioinformatics)。如今,这些方法对于原始数据的分析至关重要,能将其解释和转化为有意义的信息后共享给科学界使用[205-206]。数据库除了发挥必不可少的信息存储、维护和存档作用外,还可以充当全球在线资源存储库,且仅通过单击鼠标即可获得相关的信息(表18-2)。美国国立卫生研究院的国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)和欧洲分子生物学实验室-欧洲生物信息研究所(European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute,EMBL-EBI)(https://www.ebi.ac.uk/)是最常用的2种数据库资源,其中EMBL-EBI是世界上第一个核苷酸序列数据库,创建于1980年;NCBI则创建于1988年。在分子研究最前沿的其他优秀资源是《核酸研究》(https://academic.oup.com/nar)及其在线数据库(https://www.oxfordjournals.org/our_journals/nar/database/a/),其提供了大量生物学数据库的相关链接[207]。表18-2提供了一些非常有用的数据库和资源。当在商业上可用测序平台的范围内比较来源于这些数据库和生物信息学软件的数据时,须谨慎操作,以确保信息具有真正的可比性[208]。

八、未来展望

人类确实处在一个创新的时代，伴随着极为强大的方法学和分析工具的发展；而基于基因组的系统学和其他分析工具无疑将彻底改变原核生物系统学[11, 209]。测序方法在科学界得到越来越广泛的应用，并且已逐渐对临床实验室造成深入影响。MALDI-TOF MS 与 DNA 测序相结合，将继续在临床实验室中发挥巨大的作用。对于随着新的分类单元的不断发现，对这些新分类单元不断更新的、可搜索数据库的维护将成为一个重要的需求。最重要的是，现代分类学方法已经应用到人类微生物组和个体化医疗上[210-211]。这些研究导致了新分类单元被鉴定，以及被错误分类的微生物被重新定义。医疗卫生界必须同时掌握这两方面的知识，从而有助于临床相关微生物的正确分类。

参考文献请扫二维码查阅

第19章　标本采集、运输和处理：细菌学

ERIN McELVANIA, KAMALJIT SINGH

（沈鸿、隗明　译；刘颖梅、宁永忠　审校）

临床微生物学实验室对在实验室进行检测的标本有责任在如何选择、采集、标记及运送标本方面提供指导。标本检测分析前阶段对于获得准确的实验室结果至关重要。它能确保合理利用实验室检查，以及产生有临床意义的结果，从而改善患者结局。不正确的标本采集可引起感染部位周围菌群定植，会使实验室培养工作复杂化，并可能导致不必要和不恰当的抗菌治疗。此类不必要的治疗进而可能引起住院时间延长、费用增加及可能的明显药物不良反应[1]。

微生物学家必须以有利于实验室诊断检测的方式帮助临床医护人员选择、采集及运送标本。一项研究表明，多达50%住院患者的实验室检查申请是不恰当和无用的[2]。因此，临床微生物实验室必须制定和实施标本管理政策来促进仔细的标本采集及处理，必须做好准备去教育那些不遵守此政策的医护人员。例如，成型粪便检测艰难拟梭菌［*Clostridioides*（以前是*Clostridium*）*difficile*］毒素，或采集浅表伤口拭子标本，这些拭子标本很有可能生长共生菌群，从而使有临床意义的解释复杂化。

微生物实验室应该拥有明确的标本接收规程和政策，以及一套不合格和不足量标本的拒收系统。用于细菌培养的标本应该在疾病初发、抗菌药物治疗之前尽早采集，标本能代表感染部位以确保优质，使用适合的收集装置，并能提供足够量的标本。关于标本处理和采集详细信息请参考美国《临床微生物学操作手册》（*Clinical Microbiology Procedures Handbook*）第4章节[3]，以及美国感染病学会（Infectious Diseases Society of America，IDSA）和美国微生物学会（American Society for Microbiology，ASM）的指南[4]（2018年更新）。

一、标本采集和转运总则

微生物诊断分析前阶段包括：①从可疑感染部位采集标本；②标本采集的正确时机（最好是抗生素使用前）；③标本采集的最适合的体积或数量；④使用合适的标本采集工具及转运培养基；⑤正确标记样本和保证样本转运条件；⑥一套保证标本被接收并处理的检查系统。常见的标本选择和采集指南包括正确标记样本，标记内容包括2个患者身份标识（identifiers）、样本的来源，以及采集人员和采集时间信息。表19-1总结了常规细菌学的采集和转运推荐。

（一）标本必须代表感染部位

收集什么样的标本用于实验室诊断要根据感染部位和可疑病原菌的特性。表19-2* 列出了标本来源解剖部位，以及适当和不适当的临床标本类型[5]。

1. 抽吸物　对于皮下脓液、体液和其他液体标本，首选通过消毒未受损皮肤获取抽吸物。皮肤应先用氯己定-乙醇和碘酊彻底清洁，待皮肤完全干燥后进针抽吸。如果考虑是厌氧菌（*anaerobes*），转运容器应不含空气。目前有商品化的厌氧转运瓶，转运瓶中含有去除氧气成分的胶，胶的上面有一层氮气。

*译者注：原著引用其他著作表格，未经原作者授权翻译，故此保留原表格

表 19-1 微生物实验室诊断检测的采集、转运和储存指南[a]

标本类型	采集指南	转运装置[b]和（或）最小体积	转运时间	储存时间和温度	重复采样限制	说明
脓肿						
普通	用无菌生理盐水或70%乙醇擦拭去除表面分泌物					组织或抽吸物优于拭子标本。若必须取拭子标本，使用E-拭子转运系统或将伤口拭子置于Stuart或Amies培养基里保存
开放性	尽可能取抽吸物，或将拭子深入至病灶部位取其新鲜边缘部分	拭子转运系统	≤2 h，RT	≤24 h，RT	1/天/来源	取病灶部位的底部和脓肿壁是最有效的
封闭性	用针和注射器抽取脓肿物。无菌转移所有抽吸物至厌氧转运装置中	厌氧转运系统，≥1 ml	≤2 h，RT	≤24 h，RT	1/天/来源	表面物污染将会引入与感染过程无关的定植细菌。可以使用无针头且盖帽的注射器
血	消毒培养瓶，用70%异丙醇或氯己定消毒橡胶瓶塞30s。静脉穿刺点消毒： 1. 用氯己定-乙醇反复擦拭消毒穿刺点大约30 s 2. 至少30 s等待消毒部位干燥 3. 没戴无菌手套不要在此时触诊静脉 4. 采集血液	用于细菌培养的血培养瓶：成人20 ml/套[c]（体积越大阳性率越高）；婴儿和儿童依据其体重1～20 ml/套（表19-7）	≤2 h，RT	≤2 h，RT，或按说明	24 h内4套	急性发热期：在10 min内不同部位采集2套[c]（抗菌药物使用之前） 非急性病：未开始抗菌药物治疗或立即改变抗菌药物，24 h内不同部位采集2～4套，间隔不小于3 h（抗菌药物使用前） 心内膜炎，急性：尽可能在抗菌药物使用前，1～2 h内，从3个不同部位采集3套 不明原因发热：从不同部位采集2～4套，若24～48 h内为阴性，则再采集2或3套 儿科：立即采集；对儿童持续性菌血症，很少需要制定培养的间隔时间
骨髓抽吸液	对穿刺部位准备同外科手术切口	接种于血培养瓶或一个1.5 ml细胞溶解离心管	若在培养瓶或管中，≤24 h，RT	≤24 h，RT	1/天	少量骨髓可直接接种在培养基上。常规骨髓细菌培养很少有用
导管						
静脉内	1. 用乙醇清洁导管部位周围的皮肤 2. 无菌操作移除导管，剪下5cm导管末端，直接置入无菌管中。也有选择培养5cm的皮肤内部分来评估软组织感染 3. 立即转运至微生物实验室，以防干燥	无菌螺旋帽的管或杯	≤15 min，RT	≤2 h，4℃	无	导管尖端的培养是否有临床相关性是有争议的（译者按：十多年以来导管尖端培养均纳入临床指南，倾向于有相关性） 半定量培养（Maki滚动法）可接受的静脉内导管：中心的、CVP、Hickman、Broviac、外周的、动脉管、脐管、高营养管、Swan-Ganz（气囊漂浮导管）

（续 表）

标本类型	采集指南	转运装置[b]和（或）最小体积	转运时间	储存时间和温度	重复采样限制	说明
Foley(导尿管)	不做培养，培养物代表尿道末端的菌群					拒收导尿管培养
脑脊液	1. 采集标本前先消毒采集部位	无菌螺帽管； 最小样本量要求：细菌，≥1 ml；抗酸，≥5 ml	细菌，不要冷冻； ≤15 min，RT	≤24 h，RT	无	如果仅仅采集了 1 管脑脊液，应立即送检微生物检查；若能采集多管，则将第 2 管送检微生物检查 脑脓肿抽吸物或活检标本，可能需要检测厌氧菌或寄生虫
压疮溃疡	不选择拭子标本 1. 用无菌生理盐水清洁表面 2. 若采集不到活检标本，从溃疡底部抽吸炎性物质	无菌管/容器（需氧）或厌氧系统（针对组织）	≤2 h，RT	≤24 h，RT	1/天/来源	选择组织活检标本或抽吸物标本，拒绝拭子标本
耳						
内耳	对复杂的、反复的或慢性顽固性中耳炎做鼓膜穿刺术 1. 对完整的耳鼓室先用肥皂水清洗耳道再用注射器抽吸收集液体（鼓膜穿刺） 2. 对破裂的耳鼓室，借助耳科窥器，用软杆拭子收集液体	无菌管或厌氧转运系统	≤2 h，RT	≤24 h，RT	1/天/来源	
外耳	1. 用湿拭子将耳道的碎屑或硬皮除去 2. 在外耳道用力旋转拭子取样	伤口拭子或 E-拭子转运系统	≤2 h，RT	≤24 h，4℃	1/天/来源	对于外耳道应用力取样，表面取样可能采集不到链球菌引起的蜂窝织炎
眼						
结膜	1. 分别用（无菌生理盐水预湿）拭子绕每个眼结膜取样 2. 采集后立即接种培养基 3. 可以在采集标本时制备涂片，将拭子在载玻片上滚动 1～2 cm 的区域	直接培养接种：BAP 和 CHOC 实验室接种：E-拭子转运系统	平皿，≤15 min，RT 拭子≤2 h，RT	≤24 h，RT	无	即使只有一只眼感染，如可能两眼的结膜都要取样，以此明确固有菌群。可使用未感染眼作为对照，与分离于感染眼的细菌进行比较。如果费用限制，可根据革兰染色的结果，帮助解释培养结果
角膜刮擦	1. 由眼科医生采集标本 2. 用无菌刮铲刮擦溃疡或损伤部位，将刮擦物直接接种于培养基 3. 将刮取物在载玻片上涂擦 1～2 cm 区域，制备 2 张涂片	直接培养接种：含 10%羊血的 BHI、CHOC 和抑制性霉菌琼脂	≤15 min，RT	≤24 h，RT	无	如果采集结膜标本，采样要先于麻醉药使用，因麻醉药可抑制某些细菌，而结膜刮擦采样可以在麻醉后进行。病毒分离和阿米巴检测应将刮擦物置于无菌容器中

（续　表）

标本类型	采集指南	转运装置[b]和（或）最小体积	转运时间	储存时间和温度	重复采样限制	说明
玻璃体的液体抽吸物	备好用于针抽吸液体的眼	无菌螺帽管或直接将小量液体接种于培养基	≤15 min，RT	≤24 h，RT	1/天	包括真菌培养，麻醉药对于一些病原体有抑制作用
粪便						
常规培养	将液体或软便直接置于清洁、干燥的容器中．采集后1 h内将标本转运至微生物实验室或转移至Cary-Blair转运培养基	清洁、防漏宽口容器，或用Cary-Blair转运培养基（>2 g）	未防腐：≤1 h，RT 转运培养基：≤24 h，RT	≤24 h，4℃ ≤48 h，RT或4℃	1/天	住院超过3天或入院诊断不是胃肠炎的患者未经医生会诊不做常规粪便培养。对这些患者应考虑进行艰难拟梭菌的检测。常规病原检测不推荐拭子标本
艰难拟梭菌	将液体或软便直接置于清洁、干燥的容器中。不推荐用拭子标本做毒素检测	无菌、防漏宽口容器，>5 ml	≤1 h，RT 1～24 h，4℃	2天，4℃培养或核酸扩增检测		每24 h排泄液体或软便≥3次的患者，并且没有使用泻药。除肠梗阻患者外，成形便或硬便不推荐检测
大肠埃希菌（O157：H7）和其他产志贺毒素血清型	将液体或血便置于清洁、干燥容器中	无菌、防漏宽口容器，或用Cary-Blair转运培养基（>2 g）	未防腐：≤1 h，RT 拭子转运系统：≤24 h，RT或4℃	≤24 h，4℃ ≤24 h，RT	1/天	有腹部痉挛的患者在发病6天内采集到的血便或液体便的阳性率最高
直肠拭子	1. 小心插入拭子超过肛门括约肌1.0～1.5 in（1in＝2.54cm） 2. 轻轻旋转拭子，在肛门隐窝取样 3. 用于检测腹泻病原的拭子上应能见到粪便	拭子转运	≤2 h，RT	≤24 h，RT	1/天	对检测淋病奈瑟菌、沙眼衣原体、志贺菌、弯曲菌及肛门携带的B群链球菌或β-溶血链球菌，是保留方法
瘘	见脓肿					
液体：腹部的、羊水、腹水、胆汁、关节穿刺液、心包液、腹膜的、胸腔积液、滑膜液	1. 用碘酒充分消毒皮肤 2. 经皮穿刺抽吸或外科手术获取标本 3. 尽量多送液体；不要将拭子浸入液体内转运	厌氧转运系统、无菌螺帽管、盖帽且移除针头的注射器或血培养瓶培养细菌 立即转运至实验室	≤15 min，RT	≤24 h，RT 心包液和用于真菌培养的液体，≤24 h，4℃	无	羊水和阴道后穹穿刺液应使用厌氧系统送检，革兰染色前不需离心。其他液体检测最好用细胞离心制备方法做革兰染色。如果体积允许，强烈推荐床旁接种一个需氧血培养瓶
坏疽组织	见脓肿					防止表面样本或浅表组织的采样。应采集组织活检或抽吸物

（续　表）

标本类型	采集指南	转运装置[b]和（或）最小体积	转运时间	储存时间和温度	重复采样限制	说明
胃						
洗液或灌洗液检测分枝杆菌	卧床进食早饭前采样 1. 用鼻胃管进入胃 2. 用25～50 ml冷的无菌蒸馏水灌洗 3. 获得样本并放入防漏无菌容器中	无菌、防漏容器	≤15 min，RT或在采集1 h内中和	≤24 h，4℃	1/天	标本必须立即处理，因为分枝杆菌在胃灌洗中死亡迅速。当转运时间>1 h时，用碳酸氢钠中和
幽门螺杆菌活检组织	由消化科医生用内镜采样	含转运培养基的无菌管	≤1 h，RT	≤24 h，4℃	无	抗菌敏感性试验可能需要培养
生殖系统：女性						
羊水	经羊膜穿刺或剖宫产采集	厌氧转运系统，≥1 ml	≤2 h，RT	≤24 h，RT	无	不能接受用拭子采集或抽吸的阴道分泌物标本，因为有潜在的阴道共生菌群的污染
前庭大腺分泌物	1. 用碘酒消毒皮肤 2. 由导管抽吸液体	厌氧转运系统，≥1 ml	≤2 h，RT	≤24 h，RT	1/天	
子宫颈分泌物	1. 用无润滑剂的扩阴器使子宫颈可见 2. 用拭子从子宫颈上拭去黏液和分泌物，丢掉拭子 3. 用新的无菌拭子紧贴子宫颈管稳固但轻轻采样	拭子转运	≤2 h，RT	≤24 h，RT	1/天	参阅针对沙眼衣原体和淋病奈瑟菌采集和转运的部分
阴道后穹液	送检抽吸物或液体	厌氧转运系统>1 ml	≤2 h，RT	≤24 h，RT	1/天	
子宫内膜组织和分泌物	1. 通过内镜导管经子宫颈采样 2. 将样本全部转入厌氧转运系统	厌氧培养系统≥1 ml	≤2 h，RT	≤24 h，RT	1/天	
妊娠标本	1. 将组织的一部分置于无菌容器中 2. 如果从剖宫产获得，立即转入厌氧转运系统	无菌管或厌氧转运系统	≤2 h，RT	≤24 h，RT	1/天	不要处理恶露，该标本的培养可能会有误导作用
尿道分泌物	患者排尿至少1 h后采集 1. 拭去尿道口的渗出物 2. 通过阴道靠着耻骨联合按摩尿道，用拭子收集排出物	拭子转运	≤2 h，RT	≤24 h，RT	1/天	如未获得排出物，用聚维酮碘肥皂洗尿道周围区域，并用清水冲洗。用一个小拭子插入尿道2～4 cm，旋转拭子，至少停置2 s抽出，使之充分吸收
阴道分泌物	1. 擦除过多的分泌物和排出物 2. 用无菌拭子或吸管从阴道壁黏膜处获取分泌物 3. 如果需要涂片，再用一个拭子	拭子转运	≤2 h，RT	≤24 h，RT	1/天	对于子宫内避孕器，将整个装置放入无菌容器并RT送检。推荐用革兰染色或分子检测方法而非培养来诊断细菌性阴道病 B群链球菌定植检测需增加一个直肠拭子 推荐阴道拭子用核酸扩增方法诊断淋病奈瑟菌和沙眼衣原体

(续 表)

标本类型	采集指南	转运装置[b]和(或)最小体积	转运时间	储存时间和温度	重复采样限制	说明
生殖系统:女性或男性病变	1. 用无菌生理盐水清洗病变处,用无菌剥离刀去除病变表面 2. 使渗出液积聚 3. 按压病变的底部,用无菌拭子用力擦底部采集渗出液	拭子转运	≤2 h,RT	≤24 h,RT	1/天	
生殖系统:男性						
前列腺	1. 用肥皂和水清洁尿道口 2. 通过直肠按摩前列腺 3. 用无菌拭子采集从尿道挤压出的液体	拭子转运或>1 ml 标本用无菌管	≤2 h,RT	≤24 h,RT	1/天	前列腺分泌物的病原菌可通过按摩前、后尿标本的定量培养来确认。精液同样也可以培养
尿道	用一个小拭子插入尿道腔 2～4 cm,旋转拭子,至少停留 2 秒,使之充分吸收	拭子转运	≤2 h,RT	≤24 h,RT	1/天	男性尿道拭子推荐使用核酸扩增方法诊断淋病奈瑟菌和沙眼衣原体
藏毛囊肿	见脓肿					
下呼吸道						
支气管肺泡灌洗液、支气管刷或洗液、气管抽吸物	1. 将洗出物或抽吸物放入痰采集器 2. 将刷出物放入有 1 ml 生理盐水的无菌容器内	无菌容器 >1 ml	≤2 h,RT	≤24 h,4℃	1/天	定量分析需 40～80 ml 液体。做刷出物的定量分析,可将毛刷放入 1.0 ml 生理盐水中
咳痰	1. 在护士或医生的直接监督下采样 2. 冲洗或漱口清除口腔内过量微生物 3. 指导患者深咳获得下呼吸道标本(不是后鼻液) 4. 采集至无菌容器中	无菌容器 >1 ml 检测细菌最小量,>1 ml	≤2 h,RT	≤24 h,RT	1/天	对于不能咳痰的儿科患者,呼吸道治疗师应经抽吸获得标本
诱导痰	1. 刷完牙龈和舌头后让患者用水漱口 2. 借助喷雾器使患者吸入约 25 ml 3%～10%的无菌生理盐水 3. 采集诱导的痰到无菌容器中	无菌容器 >1 ml	≤2 h,RT	≤24 h,RT	1/天	同咳出痰
上呼吸道						
口腔	1. 用拭子拭去病变表面的分泌物和碎片,并丢弃拭子 2. 用第二个拭子用力在病变处采样,避免接触正常组织	拭子转运	≤2 h,RT	≤24 h,RT	1/天	不能采浅表组织进行细菌学评估。应选择组织活检标本或针抽吸物做细菌学检测

（续 表）

标本类型	采集指南	转运装置[b]和（或）最小体积	转运时间	储存时间和温度	重复采样限制	说明
鼻	1. 用预先被无菌生理盐水湿润的拭子插入鼻孔 1～2 cm 2. 对着鼻黏膜用力旋转	拭子转运	≤2 h，RT	≤24 h，RT	1/天	以前的鼻培养方法应保存，以用于葡萄球菌携带者或鼻病变的检测
鼻咽	1. 从鼻腔轻轻插入一个小拭子（如藻酸钙或鼻咽植绒拭子）到鼻咽后部 2. 慢慢旋转拭子 5 s 以吸收分泌物	直接在床边或检查桌上接种培养基或拭子转运	平皿：≤15 min，RT 拭子：≤2 h，RT	≤24 h，RT	1/天	海藻酸钙拭子不能用于分子检测
喉或咽	1. 用压舌板压舌 2. 用无菌拭子从咽后、扁桃体和炎症区域采样	拭子转运（有或没有硅胶的干拭子有利于化脓链球菌和白喉棒杆菌的检测）	≤2 h，RT	≤24 h，RT	1/天	喉拭子培养不能用于会厌炎的患者 检测淋病奈瑟菌的拭子应放入含碳的或其他特定的转运培养基，采集后 12 h 内接种于平皿
组织	外科手术或经皮活检过程中采集	厌氧转运系统或无菌螺帽容器。需要加几滴无菌生理盐水保持组织湿润	≤15 min，RT	≤24 h，RT	无	送检组织的量尽可能多。如可能，在−70℃保存一定量的外科组织以防进一步研究之需 不要送检组织表面摩擦的拭子 对于烧伤患者的组织培养定量检测 1 cm^3 的样本是适宜的
尿						
男性和女性首次尿（衣原体和淋病奈瑟菌核酸扩增试验）		无菌管或核酸扩增试验厂商提供的专用转运培养基	未防腐：≤2 h，RT；≤24 h，4℃	按核酸扩增试验厂商说明	1/传染期	核酸扩增试验不要采集>30 ml
女性中段尿（细菌培养）	1. 分开阴唇，开始排尿 2. 排出几毫升后，不停止尿流，采集中段尿 3. 中段尿用于细菌培养	无菌、宽口容器，≥1 ml，或有硼酸防腐剂的硼酸转运管	未防腐：≤0.5 h，RT 防腐：≤24 h，RT	≤24h，4℃	1/天	尿对细胞系有毒，因而不能用于衣原体培养标本
直接导尿管	1. 用肥皂和水完全清洗尿道口 2. 用湿纱布垫冲洗 3. 无菌操作将导管无菌插入膀胱 4. 流过 15 ml 尿之后，采集尿到无菌容器内	无菌防漏容器或有硼酸防腐剂的尿转运管	未防腐：≤0.5 h，RT 防腐：≤24 h，RT	≤24 h，4℃	1/天	导管插入可能会导致尿道菌进入膀胱并增加医源性感染的危险

（续 表）

标本类型	采集指南	转运装置[b]和（或）最小体积	转运时间	储存时间和温度	重复采样限制	说明
留置导尿管	1. 用70%乙醇消毒导管采集部分，夹住导管下部并收集10～20 min尿至管中 2. 用针头和注射器无菌采集5～10 ml尿 3. 转入无菌管或容器内	无菌防漏容器或有硼酸防腐剂的尿转运管	未防腐：≤0.5 h，RT 防腐：≤24 h，RT	≤24 h，4℃	1/天	使用留置导管的患者会存在无症状定植菌，仅对有症状患者采集尿做培养。应从新放置的留置导尿管采集尿标本
伤口	见脓肿					

注：[a] BHI. 脑心浸液；CHOC. 巧克力琼脂；CVP. 中心静脉压；RT. 室温；[b] 所有采集标本后的容器，使用带有分隔的、防漏的塑料袋转运；[c] 一套血培养包括一个需氧瓶和一个厌氧瓶

表 19-2 Selection of common clinical specimens for bacterial culture[a]

Anatomic site	Clinical specimen	
	Appropriate	Inappropriate
Lower respiratory tract	Freshly expectorated mucus with inflammatory cells (pus), sputum Bronchoalveolar lavage fluids Endotracheal aspirates	Saliva, oropharyngeal secretions, sinus drainage from nasopharynx
Sinus	Secretions collected by direct sinus aspiration and washes, curettage, and biopsy material collected during endoscopy	Nasal or nasopharyngeal swab, nasopharyngeal secretions, sputum, and saliva
Urinary tract	Midstream urine, urine collected by straight catheterization, suprapubic aspiration, cystoscopy, or other surgical procedure	Urine from Foley catheter collection bag, bagged urine from infants
Superficial wound	Aspirations of pus or local irrigation fluid (nonbacteriostatic saline), swab of purulence originating from beneath the dermis	Swab of surface material or specimen contaminated with surface material, irrigation with solution containing preservative
Deep wound	Purulence, necrosis, or tissue from deep subcutaneous site	Specimen contaminated with surface material
Gastrointestinal tract	Freshly passed stool, washes, or feces collected during endoscopy; FecalSwab in Cary-Blair medium (Copan)	Rectal swab
Venous blood	Two to four blood specimens collected from separate venipunctures before initiation of antibiotics, each containing ~20 ml of blood for patients >90 lb (see Table 7 for pediatric volumes)	Clotted blood

[a] Modified from reference 6 with permission.

通常情况下，无菌体液（如胸腔积液、滑膜液、腹水、心包液）都是抽吸出来并注入无菌管或 EDTA 抗凝管（避免血凝块形成）做革兰染色并接种到培养基，除了血性和黏稠的液体标本，都应在革兰染色前用离心涂片机离心涂片。许多中心机构推荐注入一定量（接种量参考血培养系统的厂家说明书，最好 10 ml）的样本到需氧血培养瓶进行培养[4]。

肠穿孔出现的腹腔内容物经介入放射科医生用细针抽取，常送到实验室进行培养。社区获得性感染主要是由肠杆菌科（*Enterobacteriaceae*）细菌、肠球菌（enterococci）和厌氧菌引起。培养工作在一定程度上仅限于挑选最多 3 个或更少分离株。然而，医院内感染或免疫力低下病人的感染可能还包括金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、念珠菌属（*Candida* spp.）及多重耐药菌的感染，因此需要修改操作规程。关于何时、如何进行腹腔内容物培养，按共识标准和建议处理[4,6]。

2. 硬件和假体 当怀疑假体关节有感染时，可从感染部位分别送检 5 次活检组织，若其中至少有 2 次分离出同一种病原菌，就有助于感染诊断并区分是污染还是真的感染[7-8]。然而，假体有可能形成一层生物膜导致持续感染，而且使用关节液或组织很难诊断。假体在一定量液体中经超声处理后，与标准的组织培养相比，能提高微生物检出的敏感性[9]。植入的心脏设备，如起搏器和心律转复除颤器，经过超声处理后，也能提高微生物检出的敏感性[10]。另外，其他的硬件超声处理，如脊柱移植物已有报道[11]。对于没有超声仪等专业仪器的科室，一个不错的替代方法就是添加无菌盐水到假体里漩涡震荡，然后直接接种盐水到培养基。关于假体相关感染诊断包括植入的心脏设备，实验室应该坚持送检组织（拭子不行）[12]。

3. 痰 咳痰是诊断肺炎最好的非侵袭性标本。除了肺囊性纤维化的患者，其他患者的痰质量应该进行显微镜下评估，明确是否存在鳞状上皮细胞（SECs）、炎性细胞和细菌[13-14]。对于大部分肺炎患者，如果在采集人员正确指导下，能获得优质痰标本。方法是：让患者坐直，先用清水漱口，鼓励患者深咳。有时轻轻叩击胸部能够帮助咳出深部痰。如果患者第一次不能咳出合格痰，那么重复采集也不太可能获得高质量的痰，最好是通过预约呼吸道治疗，尝试获取诱导痰。对于一些呼吸道疾病如肺炎链球菌肺炎和军团菌肺炎，因为不可能获得可信赖的痰，有必要进行尿抗原试验，该试验敏感性相对不错（取决于方法），但特异性的报道不一[15-16]。

4. 粪便 粪便比直肠拭子更适合用于细菌培养检测，粪便也被推荐用于新型多重分子胃肠道微生物检测。当不能获取粪便，只能采集直肠拭子时，拭子应该插入肛门足够深，到达直肠后再采

集样本，直到看见拭子上有粪便的颜色。为了保证病原菌存活，拭子应该放到转运培养基中送检，如 Cary-Blair 粪便拭子(Copan，Murrieta，CA)。

有些病原菌在粪便中不稳定，如志贺菌(*Shigella*)，如果没有用转运培养基(如 Cary-Blair 培养基)送检粪便，则应该尽快将粪便接种到培养基上。没有必要送检多份粪便标本检测粪便病原菌[4]。在成人，87%的第 1 份粪便标本能检测出肠道病原菌，第 2 份标本阳性率提升到 98%[17]。对于儿科患者，98%的第 1 份粪便标本能检测出肠道病原菌[18]。新鲜粪便首先检查外观，尽量挑取血性、脓性、黏液的部分送检。腹泻标本是稀便，呈现出容器的形状。除外诊断为肠梗阻的患者，成型粪便不能被用于检测艰难拟梭菌，因为 4%～15%的人是无症状携带者，检测艰难拟梭菌有可能导致对这部分人不正确的诊断和治疗[19]。年龄不到 2 岁的儿童常有产毒素艰难拟梭菌定植，这部分儿童也不推荐检测艰难拟梭菌[4](第 55 章)。

5. 拭子 尽管拭子容易采集，但一般次于组织或者液体标本，一定避免用拭子采集手术室标本。拭子采集的标本量常常不足而且容易被共生菌污染。需要经常培训和强化来阻止拭子的不适当使用，尤其对于外科工作人员。拭子用于培养厌氧菌、分枝杆菌及真菌效果很差。当样本需要接种多种培养基时，不能用拭子采集，因为拭子标本需要稀释才够接种量。无论何种情况下，真正的标本(组织、抽吸物或活检)都优于拭子标本[4]。不建议用拭子采集压疮溃疡的表面做培养，因为采集到的可能是双重感染表面的定植菌，使结果难以解释[20]。

拭子一般适用于采集口咽部标本，从技术上说使用拭子更容易接触到扁桃体，而且也不需要接种多种培养基。但是，采集拭子标本时应注意不要触及非感染部位的表面或黏膜，因为它们栖居有污染细菌。用于检测白喉棒杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)和化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的拭子可以在干燥条件下转运(使用干燥剂可提高存活率)[21-22]。也不推荐拭子用于鼻窦炎诊断，抽吸物或组织更适用于鼻窦炎诊断。内镜下采集拭子标本能检测到病原菌，但是很少检测到真菌，而慢性鼻窦炎的常见病原菌是真菌[4]。

拭子技术的新进展明显改进了传统拭子。现已证实，在检测细菌时，采用植绒拭子和 E 拭子转运系统(Copan，Murrieta，CA)优于纤维拭子[23]。在垂直于中轴上，植绒拭子的纤维有很多微小的褶皱，这些褶皱能明显增加表面积从而提高标本采集量。E 拭子转运管含有 1 ml 的液体培养基如 Amies 和 Stuart 培养基，当拭子置入液体培养基中并漩涡震荡时，标本能从拭子的纤维中释放出来。对接种标本的一次评估中，置于转运培养基中的植绒拭子，冷藏保存时，某几种厌氧菌可活至 24 h[24]。它们可以用自动接种仪接种[25]。从拭子上洗脱标本的能力的提高及使用更多的液体样本量有助于提高细菌的检出[25-26]。

6. 组织 活检组织应该由外科医生用无菌技术采集。在皮肤切开前必须用氯己定-乙醇消毒皮肤。当出现第一道切口时，有可能无意中切到表皮下少量共生菌群[如痤疮丙酸杆菌(*Cutibacterium acnes*)，曾用名 *Propionibacterium acnes*]和表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)，外科医生需要换一把新的无菌手术刀。组织需放入一个厌氧转运瓶中。如果不考虑厌氧菌感染，组织可以放入带密封盖的无菌管或无菌杯中。采集引流窦道里的坏死组织，需要在彻底消毒表面皮肤后，用刮匙在窦道的内部深深刮取。用拭子采集引流液标本有可能会沾到表面的细菌，这些表面的细菌可能与深部的感染无关。诊断骨髓炎的骨活检组织要在表面组织清创后直接从骨本身获取，而表面组织通常是双重感染的[27]。感染的骨组织比较软，比较容易刮取获得，有时可用大号钻孔针抽取。

7. 尿 尿可以用多种方法收集：中段尿、导管尿(直接插入导管取尿或留置导管取尿)、膀胱镜下采集或耻骨上抽吸。不应送检或接收导尿管管尖培养，因为导管尖常会被尿道菌群污染，也不可能做定量检测。鉴于相同原因，婴儿口袋尿标本(将一个袋子附着于会阴处)也不应做培养[28]。

(二)标本量和标本大小

通常情况下，送检的标本量越多越好，特别是需要进行多种培养时。但是收集的标本量或标本大小多于所有试验需要量可能也是个问题，特别是由未经充分培训的人员选择用于微生物检验的标本时。临床医护人员不能送检大袋子的液体，除非腹膜透析液(因实验室人员要从中取 50 ml 离心浓缩)；也不要送大块的组织，因为这会增加标本在实验室过多的处理过程，由此可能引起污染或导致测试样本的检出率低。如果可能，用于

常规细菌培养和革兰染色的材料至少应送检 1 ml 液体和 1 g 或 1 cm^3 组织，对于额外的检测需要送检更多的样本[29]。如果收到标本的体积不够做医生申请的全部检验项目或不够接种所有常规需要的培养基，应跟临床医生沟通，并根据医生要求先做最重要的检测。这不仅能帮助微生物室人员选择合适的检验项目，也能提醒医生标本是有问题的，并能够督促医生以后留取足量的标本。标本量不足的问题，通常是出现在介入放射引导下的细针穿刺取活检组织送微生物检测时。

(三)标本转运

检测试验的类型决定了转运系统的类型。不同类型的拭子和转运培养基应该在使用前进行性能验证，应该由产商做这些性能验证，实验室也要对转运装置做验证。验证标准的选择对实验室很重要并且需要监测。例如，有些转运培养基(美国 FDA 批准)中细菌没能存活，但革兰染色后可以在显微镜下看到，所以微生物学家不妨抽取几批产品，查明能被染色但细菌已死亡的不合格批次。美国临床实验室标准化协会(The Clinical and Laboratory Standards Institute)已经制定出评估转运装置的标准[30]。表 19-1 总结了常规细菌的转运方式。

1. 标本采集后尽快送到实验室。对于大多数标本而言，如果转运时间超过 2 h，就需要特殊的转运培养基或在冷藏条件下转运(表 19-1)。仅用于分子诊断的样本，可以冷藏甚至是冷冻(−80 ℃最佳)。当使用市售分子诊断试剂盒时，必须使用厂家推荐的或者盒内配套的转运材料。当使用的样本采集方法和体外诊断试验的操作与产品说明书不一致时，实验室应该对试验的性能进行验证。

2. 即使保存培养基正确或者冷藏条件下保存，标本也应在 24 h 内接种到细菌培养基上。

3. 标本量较少的体液标本(<1 ml)或组织标本(<1 cm^3)必须在 15～30 min 内送到实验室，以避免蒸发、干燥及暴露在周围环境中。可以加少量的几滴非抑菌盐水保湿。大体积的标本或放在保存培养基中的标本，最长可以储存 24 h。

4. 对周围环境特别敏感的细菌包括：百日咳鲍特菌(*Bordetella pertussis*)、志贺菌属(*Shigella* spp.)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)及厌氧菌。这些标本立即处理才能获得可靠结果。在转运培养基保存条件下，当超过 6 h 再处理标本时，会导致菌落形成单位(CFU)有些减少[31-32]。如果耽搁时间更长，会导致微生物的大量丢失。对于超过 6 h 没有处理的标本，冷藏能提高细菌存活，但是，含有厌氧菌的标本应该保存在常温[30]。

5. 当临床标本和感染物质从这间实验室运到另一间时，不管距离远近和使用何种运输工具，要求粘贴联邦政府授权的标本包装和标识说明。转运的材料必须有正确的标识，必须包装得好到在出现破损或溢出时能吸收和容纳全部流出物，并在运输过程中受到保护。更多详细信息请见美国 CDC 网页(http://www.cdc.gov/od/eaipp/shipping/)和国际航空运输协会网页(http://www.iata.org/publications/dgr/Pages/other-dgrproducts.aspx)。

6. 对于一些苛养菌，实验室应该对转运方法给予明确说明[33]。如果标本需邮运到较远的参考实验室，则必须符合参考实验室的条件和要求，在很多情况下，参考实验室会提供运送装备。持续与医生及其他医护人员保持沟通，以保证他们在标本采集之前能获得有关标本采集和转运的准确信息。

二、实验室标本处理

(一)登记标本的到达和状态，以及标本是否适合于申请的项目

标本到达实验室后应记录接收日期和时间，应仔细核对所有标本和申请单。标本必须有明确的标识，如果附有检验申请单，则至少应包括两个患者身份标识码。申请单必须包括以下信息：患者姓名、年龄、性别、ID 号(如病历号或登记号/账单号)、位置(医院房间号、医生办公地址等)；申请医生名字；标本来源(详细说明)；采集日期和时间；检测项目。如果使用电子信息系统，以上相关信息都可以通过信息系统获取。如果标本标记错误或没有患者姓名，则需重新采集标本。如果标本不能重新采集(如手术过程中采集的组织标本)，必须联系医生或护士亲自确认标本。如果是重新标记过的标本，必须在检验结果报告中明确标出，以便于临床医生在解释结果时，能意识到因标本重新标识可能引发潜在错误。每一份实验室处理的标本都应有一个唯一的实验室编号。接下来，应记录

接种时间，接种时间可能完全区别于接收时间。

(二)标本拒收

尽管有些标本标识合格，但因采集部位、转运容器以及转运条件不符合要求也不能进行检测[34]。表19-1根据标本采集、转运条件和转运时间，列出了标本管理可接受标准。当送检的标本不符合这个标准(转运时间过长、转运温度不对、未使用合适的转运培养基、标本的采集部位与所申请检测项目不符等)，应尽可能地重新采集新标本。表19-3列出了厌氧培养的拒收标本类型，拒收的主要原因包括不正确的转运条件、采集的标本质量差及标本类型与申请项目不符(表19-3和表19-4*)。

表 19-3 适合厌氧培养的各种标本

可接收的标本	拒收的标本
抽取物	支气管肺泡灌洗冲洗
前庭大腺炎性物/分泌物	子宫颈分泌物
血液	气管内分泌物
骨髓抽吸物	恶露
支气管镜采集的分泌物(保护性的毛刷)	鼻咽拭子
阴道后穹穿刺液抽吸物	会阴拭子
输卵管液或组织	前列腺液或精液
宫内节育器，针对放线菌属	鼻窦冲洗或拭子
鼻窦抽吸物	痰
胎盘组织	粪便或直肠拭子样本
粪便，针对艰难拟梭菌	气管造口分泌物
外科抽吸物或组织	尿道分泌物
经气管抽吸物	尿(排出或从导管导出)
膀胱镜检尿	阴道或外阴分泌物

表 19-4 Suggested rejection criteria for specimens submitted for culture

Specimen	Comment
Sputum specimen with >25 SECs per LPF (10×)	Most likely represents saliva. Request new specimen.
Dry swab (not in transport container)	
Single swab or small fluid volume (<1 ml) or tissue (<1 cm^3) for multiple tests: Gram stain, aerobic, anaerobic bacteria culture, AFB smear and culture, viral tests, etc.	Ask physician to prioritize tests
Swab for AFB or fungal smear and culture	Request tissue or aspirate
Unpreserved urine >24 h	
Foley catheter tip	
Duplicate (>1 specimen) on same day: urine, stool, sputum, wound, and throat	
Specimen container not labeled or different labels than requisition form	Request new specimen or physician/nurse identify and correct specimen labeling in person for irreplaceable specimens
Improper, nonsterile container or container in which part of specimen has leaked	Request new specimen. If additional material cannot be collected, alert physician/nurse that specimen may have been contaminated and document in records.
Specimen for *N. gonorrhoeae* and/or *Chlamydia* culture received in NAAT transport tube	
Specimen received in formalin	
Specimen for anaerobic culture not received in anaerobic transport tube	Unless tissue from surgical room transported immediately to the laboratory in sterile container or fluid in capped syringe without needle
Central venous catheter tip without concomitant blood cultures	
Nasopharyngeal swabs for bacterial culture	Not predictive of sinus, middle ear, or lower respiratory tract infection
Culture of lochia, cervix, urethra, or vagina samples for other than *N. gonorrhoeae* or group B *Streptococcus*	
Gram stain for *N. gonorrhoeae* on specimens from cervix, vagina, or anus	These sites may harbor nongonococcal *Neisseria* spp.
Culture of gastric aspirates or bowel contents, e.g., colon, ileostomy, or colostomy	
Formed stool for *C. difficile* toxin testing	Use objective criteria such as Bristol stool score or "stick test."[b] Rectal swab is acceptable for patients with ileus.
Stool culture for enteric pathogens for inpatients >3 days	Low yield in patients hospitalized >3 days. Recommend stool *C. difficile* test instead.
Culture of implantable devices, e.g., pacemakers, leads, screws, plates, penile implants, etc.	Request tissue or fluid. Reasonable alternatives include sonication of device (but requires specialized equipment), or add sterile saline, vortex, and aliquot samples to culture plates.

[a]Abbreviations: LPF, low-power field; AFB, acid-fast bacilli.
[b]Reference 158.

*译者注：原著引用其他著作表格，未经原作者授权翻译，故此保留原表格

通过检查标本量和细胞组成来评估标本质量。尽管很多标本因采集方法或感染部位的大小限制了标本采集量，但某些标本（如尿、粪便和痰）可以采集足够的量进行检测。如果其他的标本容易大量采集，则可以要求送检新的、更多的标本。有些情况下，标本体积太大也要考虑拒收。例如，用于沙眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*）和淋病奈瑟菌分子检测的尿量 > 30 ml 时，极少的感染颗粒被稀释，从而产生假阴性结果。标本拒收时要联系患者的医护人员，向其解释拒收的原因并要求重新采集合格标本。及时通知及重新采集标本很有必要，特别是在已经开始使用抗菌药物的情况下。标本拒收准则实施前应该由实验室及医护人员代表共同审阅，如果判断标本中大量的细菌是由于正常菌群的污染，例如，痰标本涂片革兰染色发现大量的上皮细胞，此标本应拒收。

(三)远距离采集标本的处理

远距离采集标本的处理转运和处理时间限制了标本采集地点，适合附近的实验室而不适合较远的实验室。如果标本通过公共或是私人邮政服务都应该以相同的方式处理，详见健康和安全 CDC 办公室网站，或者转运途径和危险物安全管理网站（http://www.phmsa.dot.gov/hazmat/standardsrulemaking/hmic）的最新指南。使用温控箱、可靠的快递服务、优秀的跟踪系统来管理标本运送是目前服务公司面临的挑战。

(四)优先化

对于在短时间内接收大量标本的繁忙的实验室，使用标本优先处理表，能帮助工作人员决定标本处理的顺序[34]。申请 STAT 检测的标本，如革兰染色，仍在手术室的患者的标本享受最高优先权。

(五)标本初步处理

1. 拭子在做革兰染色之前应该先接种含有抑制因子最少的培养基。对在液体培养基里的植绒拭子，应该震荡混匀，采用混悬液进行涂片或接种培养基。痰是最容易用木签挑出的标本，不要吸取液体部分，而是挑取可能存在病原菌的脓液部分。

2. 清亮的体液标本（除外尿）应使用细胞离心甩片机（cytocentrifuge）浓缩后制备涂片。如果没有细胞离心甩片机，可以使用普通离心机，大于 1 ml 的标本离心（1500 ×g，15 min）后，用移液管吸出上清，剩余 1 ml 沉淀[35]。充分混匀此沉淀（振荡器或移液管）后用于检测。只有当标本较浓、血性或是明显的脓，可以直接涂片不用离心，但是涂片要薄，类似于血液薄膜片。

3. 用于细菌培养的组织或骨标本应该在研磨器里研磨，组织标本还可以使用自动匀浆器（Seward limited, Worthing, WestSussex, United Kingdom）。取一滴混悬液划线来获得单个菌落。如果要求做真菌培养，组织和骨标本需要使用无菌手术刀剪碎（不能研磨），接种一小块完整的组织到每块琼脂培养基里面，以确保毛霉菌（*Mucorales*）类能生长。

4. 所有的体液和组织标本均应做革兰染色，另外一些拭子标本如诊断细菌性阴道病（BV）的拭子标本也应做革兰染色（表 19-5）。革兰染色可以给医生快速的、可行的结果，可以根据细胞特点来判断标本是否合格做培养，也应当用于帮助微生物学家解释培养结果[34]。感染会产生脓液（丰富的白细胞）、血液、坏疽、黏液（黏膜标本）等。通常，标本肉眼检查时应鉴定出黄到黄褐色的脓液、红色到铁锈色的血液、清亮或黏性的黏液，以及棕色到黑色的变色坏死组织。然后，从这些地方挑取标本进行涂片和培养。理想状态下，使用×10 倍物镜进行涂片显微镜下检查，应能看见许多多形核细胞（polymorphonuclear cells，PMNs），而上皮细胞很少或没有。上皮细胞代表的是有正常菌群污染的皮肤或黏膜（图 19-1 和图 19-2）。

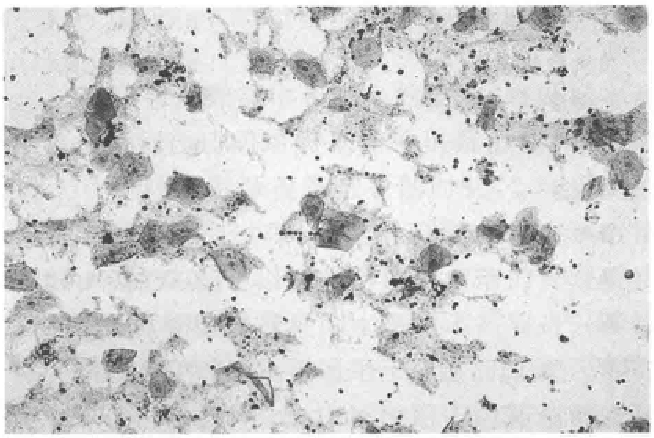


图 19-1　革兰染色（放大倍数，×100），不可接收痰标本（严重被口咽部微生物群污染），显示 > 10 个鳞状上皮细胞/低倍视野，见彩插

表 19-5 细菌学标本或器官的革兰染色和培养基接种的建议[a]

标本或器官	革兰染色	需氧培养基	厌氧培养基[b]	说明
体腔内液体	×(需要分离液体标本)			若标本充足，剩余无菌体液应接种于血培养瓶，增加检验敏感性
脑脊液(常规)	×	B、C		
脑脊液(分流)	×	B、C、Mac、Th		
心包积液	×	B、C	BBA	
胸腔积液	×	B、C	BBA	
腹水	×	B、C、Mac、CNA	BBA、LKV、BBE	
持续不卧床腹膜透析	×	B、C、Th	BBA	将液体标本床旁接种于血培养瓶
滑液	×	B、C		若标本充足，将标本接种于血培养瓶
骨髓	×	B、C	BBA	若标本充足，将标本接种于血培养瓶；分离系统用于检测布鲁菌和胞内菌
导管尖		B		
外耳液/拭子	×	B、C、Mac		
内耳液	×	B、C	BBA	
眼	×	B、C		
泌尿生殖道				
阴道/子宫颈	×	B、TM		革兰染色是诊断细菌性阴道病的首选方法
尿道/阴茎	×	TM		
其他	×	B、C、Mac、TM、CNA	BBA、LKV、BBE	
B 群链球菌筛选(阴道/肛门筛选)		选择性肉汤传代培养到 B，显色筛选琼脂		增菌肉汤中取标本进行 PCR 检测
下呼吸道				
痰	×	B、C、Mac、BCSA/OFBPL，甘露醇盐，以及 IMA 用于囊性纤维化患者)		
气管吸出物	×	B、C、Mac		
支气管肺泡灌洗液	×	B、C、Mac、CNA		
支气管镜毛刷，清洗液	×	B、C、Mac、CNA	BBA、LKV	仅支气管镜保护性毛刷(厌氧条件转运的标本)可进行厌氧培养
组织	×	B、C、Mac、CNA、Th	BBA、LKV、BBE	
上呼吸道				
鼻咽		B、C		
鼻		B、显色琼脂(MRSA 筛选)		
喉		B 或 SSA		
粪便		B、Mac、HE、Ca、EB(可选)：山梨醇 Mac/显色琼脂/志贺毒素试验		空肠弯曲菌/大肠弯曲菌在 5% O_2-10% CO_2-85% N_2，42℃ 环境下培养
尿		B、Mac 或显色琼脂		尿标本的革兰染色对住院儿童和成人的快速诊断和指导治疗很有帮助

（续 表）

标本或器官	革兰染色	需氧培养基	厌氧培养基[b]	说明
伤口或脓肿				
拭子	×	B、C、Mac、CNA	BBA、LKV、BBE	抽吸物或组织更适合，对非侵入性拭子不应做厌氧培养
抽吸物	×	B、C、Mac、CNA	BBA、LKV、BBE	
百日咳和副百日咳鲍特菌		Regan-Lowe		核酸扩增比培养更敏感
布鲁菌		B、C		考虑加入分离管
白喉棒杆菌		胱氨酸-亚碲酸盐或 Loeffler 血清		
艰难拟梭菌		CCFA		核酸扩增比培养更敏感
大肠埃希菌 O157：H7（肠出血性大肠埃希菌，产志贺毒素大肠埃希菌）		山梨醇 Mac/显色琼脂		志贺毒素酶免疫测定或核酸扩增试验比培养更敏感
土拉热弗朗西丝菌		C 或 BCYE		考虑加入分离管
杜克雷嗜血杆菌	×	C＋万古霉素（3 μg/ml）		革兰染色像鱼群
幽门螺杆菌		BHI，CAN，其他（第 59 章）		弯曲菌气体环境 35～37℃
军团菌属		BCYE		
钩端螺旋体		Fletcher 培养基或 EMJH		30℃培养至 13 周
淋病奈瑟菌	×	TM		革兰染色可能适用于成年男性尿道标本
弧菌属		TCBS		
小肠结肠炎耶尔森菌属		CIN 或 MAC		温度保持在 30℃

注：[a]B. 血液琼脂；BBA. 布鲁菌血琼脂；BBE. 拟杆菌胆汁七叶苷琼脂；BCSA. 洋葱伯克霍尔德菌选择琼脂；BCYE. 平衡活性炭酵母抽提物琼脂；BHI. 脑心浸液；C. 巧克力琼脂；Ca. 弯曲菌琼脂；CAPD. 持续不卧床腹膜透析液；CCFA. 环丝氨酸-头孢噻吩-果糖琼脂；CIN. 头孢磺啶-氯苯酚-新生霉素琼脂；CNA. 黏菌素萘啶酸琼脂；EB. 增菌肉汤；EHEC. 肠出血性大肠埃希菌；EMJH. Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris 培养基；HE. Hektoen 肠道琼脂；LKV. 含卡那霉素和万古霉素的已溶血琼脂；Mac. 麦康凯琼脂；SSA. A 群链球菌选择性琼脂平板；TCBS. 硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂；Th. 巯基乙酸盐肉汤；TM. Thayer-Martin 琼脂。[b] 如果标本采集转运适当，根据检验申请进行厌氧培养。如果适当的标本没有申请厌氧培养，给医生打电话沟通

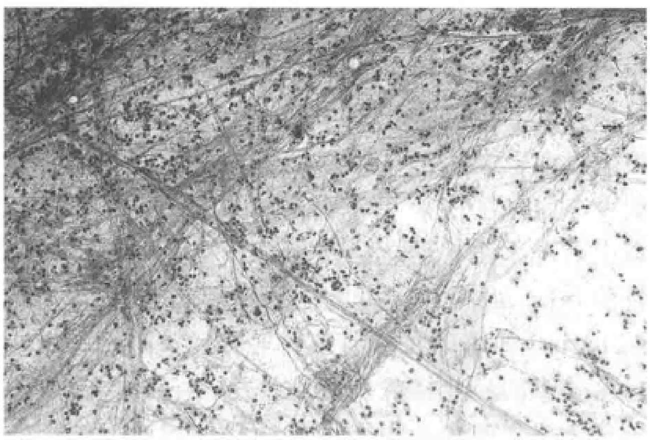


图 19-2 革兰染色（放大倍数，×100），可接收痰标本，显示<10 个鳞状上皮细胞/低倍视野，见彩插

5. 根据采样部位和医生的要求，每份标本都应该接种到合适的培养基以检出疑似病原菌（表 19-5）。在这个资源逐渐减少的时代，2 项近期的发明改进了这个过程，即显色琼脂和自动平皿接种仪。显色琼脂可以通过形成的菌落的外观直接将病原体鉴定到属或种的水平而不需要进一步检测。这些显色琼脂不仅适用于尿道病原菌[36]和粪便病原菌的检测[37]，也广泛地用于耐药菌筛查标本，例如，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *S. aureus*，MRSA）、耐万古霉素肠球菌（vancomycin-resistant enterococci，VRE）和多重耐药革兰阴性杆菌[38-39]。在很多情况下，这种

显色培养基的经济效益优于传统鉴定细菌的方式，可以节约时间和试剂。

多种自动培养基接种仪已经应用于临床，已报道的接种效果至少和手工接种一样，并且可以减少工作量，尤其是在工作人员紧缺的实验室[40]。有些设备要求标本接种到平皿上，有些仪器是可以处理含有液体标本的容器，包括 E 拭子[41]。随着实验室人员逐渐精简，这些仪器在越来越多地被实验室采用(第 6 章)。

增菌肉汤的使用是有争议的，应该加以限制(表 19-5)。很多样本，如拭子标本，经过增菌肉汤培养后，更有可能生长污染的皮肤正常菌群，而不是病原菌[42]。当培养苛养菌或者细菌量较少的标本时，如心瓣膜，使用增菌肉汤很有意义。但当同时接种的平皿有细菌生长时，继续对增菌肉汤进行操作的作用和效果不大。当发现某个样本有 PMNs 或其他的感染指征，而平皿没有细菌生长时，增菌肉汤至少要放 5 天，有时甚至要放 14 天以上，如人工关节感染液体中的痤疮丙酸杆菌(*C. acnes*)。而皮肤生长的细菌如凝固酶阴性葡萄球菌(coagulase-negative *staphylococcus*)、丙酸杆菌属(译者注：删除对 Propionibacterium 的翻译，它是 Cutibacterium 之前的名称)的生长，必须评估其与临床标准吻合度，避免过度解释[43]。留置分流术后的脑脊液接种增菌肉汤后，需要放置 14 天。

根据实验室操作文件要求(表 19-5)，样本一旦接种到适合的培养基，在检测是否有细菌生长之前，平皿和肉汤都要放到合适的培养环境孵育。巧克力培养基总是放在 5% 的 CO_2 环境中，血平皿可以放在空气或 CO_2 环境中孵育(根据需检测的微生物的要求)，选择性琼脂平皿最好放在空气环境中孵育，特殊孵育环境在介绍菌种的章节会提到，如微需氧菌生长条件。除非特别说明，细菌生长的理想温度是 35～37 ℃。

培养厌氧菌的标本到达实验室后要尽快处理。常用于厌氧培养的培养基包括一个厌氧血平皿(CDC 血平皿或布鲁菌血平皿)，一个可以抑制革兰阳性菌生长和兼性厌氧革兰阴性杆菌生长的平皿[如 KV 血平皿(卡那霉素-万古霉素)]，一个鉴定或选择性培养基(如拟杆菌胆汁七叶苷培养基)，一个革兰阳性选择培养基(黏菌素-萘啶酸血平皿或苯基乙醇血平皿)及一个增菌肉汤(如庖肉培养基或巯基乙酸盐培养基)(表 19-5)。接种后立即将培养皿放到厌氧环境中孵育，可在厌氧小容器内孵育，如 GasPak jars(BD 微生物系统，Cockeysville，MD)、AnaeroPack(Mitsubishi Gas Chemical Ainerica，Inc.，New York，NY)或 Bio-Bag 厌氧培养装置(BD 微生物系统)，也可以放到大厌氧箱内[44]。还有一个上市产品(Anoxomat；Mart Microbiology，Drachten，The Netherlands)能够在一个特殊的罐子里快速地抽掉空气，再用厌氧气体置换用于厌氧菌培养。与需氧或兼性厌氧菌相比，厌氧菌生长较缓慢。在 48 h 内不能打开厌氧罐或厌氧箱，以保证处于生长阶段的厌氧菌不会因为暴露于氧气而死亡。厌氧菌培养至少要放置 5 天后才能出阴性报告。延长增菌肉汤孵育时间(至少 7 天)对于分离放线菌(*Actinomyces*)、人工关节感染的丙酸杆菌属，以及一些苛养厌氧菌很重要[45]。

6. 鉴于很多原因，最好保留标本，即使是标本已用完，也要保留空容器。因为有时在其他结果如组织病理学检查出来后，还需要补充其他检测。有时候在实验室操作过程中会出现错误，需要从原始标本中重新取样。其他的原因还包括：核对标本的标签，第一张涂片的解释有问题时要做第二张涂片，或是需要检查样本的外观等。如果有可能，标本应该保存在冰箱或者是超低温冰箱，至少要放置 5 天。

(六)用于细菌分子检测的标本转运

根据检测系统的不同，细菌分子检测的操作程序以及转运系统也不同。新鲜粪便标本和采集到 Cary-Blair 转运培养基的粪便标本适合用多重胃肠检测试剂盒或者是分子检测方法检测艰难拟梭菌。组织标本应采用无菌技术采集并放入无福尔马林的无菌容器内，送检的组织标本有时用分子扩增或者 DNA 测序的方法检测细菌病原体。如果组织标本采集后 24 h 内不能进行检测，则需要将组织冷冻保存在−70 ℃环境下，在转运到实验室的过程中用干冰防止融化。用于分子检测的百日咳鲍特菌(*B. pertussis*)和肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*)可以在室温条件下转运。需要专用转运培养基的一些特殊拭子或晨尿(<30 ml)，常用于淋病奈瑟菌和沙眼衣原体的分子检测。转运系统应该根据检测类型来确定。近期的 IDSA/ASM 指南提出了这些问题[4]。

三、病原菌相关的实验室安全问题

任何标本都有可能含有感染物质，对此工作人员应该时刻保持警惕。应培训临床医生，当他们怀疑有危险病原菌感染时应该警告实验室，如粗球孢子菌（*Coccidioides immitis*）或波萨达斯球孢子菌（*Coccidioides posadasii*）、布鲁菌（*Brucella*）和土拉热弗朗西丝菌（*Francisella tularensis*）等，都会对实验室工作人员健康构成威胁[46]。如果实验室有可能会遇到这些病原体，实验室针对可能会遇到的病原体接种合适的疫苗，如脑膜炎奈瑟菌以及其他不寻常的病原体。为了防止标本污染，所有的标本操作应该在生物二级安全柜（BSL2）里进行，工作人员应该佩戴个人防护装置，包括防水工作服和手套，以减少事故暴露。操作产生气溶胶的标本或者是有可能进入气溶胶环境的实验室工作人员，必须佩戴N95口罩或防护呼吸面罩。在任何有气溶胶存在的情况下，必须佩戴这些口罩。职业安全与健康管理局颁布了针对潜在肺结核和严重急性呼吸综合征的呼吸防护标准，其他管理机构和很多雇主把这些原则扩展到其他的呼吸道危险因子（https://www.osha.gov/SLTC/respiratoryprotection/standards.html）。CDC最新《生物安全手册》中有对科研实验室的指南，可以在下面的网站找到：http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/bmbl.pd。CDC提供了一个关于临床实验室的发病率和死亡率周报（*Morbidity and Mortality Weekly Report*）（http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/su6101a1.htm）。本书第13章有对实验室生物安全更深入的讨论。

工程控制

实验室环境应根据工作性质设计使工作人员免受生物危害。准备好使用正确维护和认证的生物安全二级（BSL2）层流安全柜，培训人员正确使用这类设备也非常重要（第13章），实验室若没有BSL2生物安全柜，则所有能产生气溶胶的操作和所有涉及血液和体液标本的操作（如血培养瓶的操作），都应该在树脂玻璃挡板后或其他的防护装置后操作。标本在医院内转运应该使用边缘和底部坚固的运送箱运送，以防止意外摔落时标本洒溢。怀疑有危险病原体生长的平皿应该在两侧用胶带封口，允许空气循环，但不允许平皿被意外打开。所有的实验室工作人员都应该知道当出现意外泄漏事故时应该如何应对，并定期进行演练来加强事故应对能力。

四、特定标本采集和操作建议（表19-6）

（一）尸体解剖标本

微生物检查作为尸检的一项工作还存在争议[47]。死后和濒死状态对无菌组织的影响会混淆阳性培养结果的意义，促使一些人反对微生物学检测。而另一些人发现，不论在社区还是大学医院，一些使用现代高科技医学漏过的诊断，可以通过尸检继续揭示大量感染的诊断[48]。为了降低尸体解剖标本的污染，死亡后尸体应尽快地转移到冷藏柜内保存（4～6 ℃）。标本采集应该在死亡后15 h内从冷藏尸体采集，这样可以减少尸体身上污染原的过度生长，也可提高真正病原菌的检出率。

表19-6　几种感染性疾病综合征的常见病原体

疾病	病原体
中枢神经系统感染	
急性脑膜炎，中性粒细胞增多	肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟菌、单核细胞增生李斯特菌、无乳链球菌、流感嗜血杆菌
急性脑膜炎，脑脊液分流	凝固酶阴性葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、丙酸杆菌属、革兰阴性肠杆菌（如大肠埃希菌和克雷伯菌属）、革兰阴性非发酵杆菌（如铜绿假单胞菌和不动杆菌属）
慢性脑膜炎，淋巴细胞显著增多	奴卡菌属、布鲁菌属、钩端螺旋体、结核分枝杆菌、梅毒螺旋体（又称苍白密螺旋体）、伯氏疏螺旋体

（续 表）

疾病	病原体
胃肠道感染	
感染性腹泻[a]	沙门菌血清型，志贺菌属，空肠弯曲菌/大肠弯曲菌，弯曲杆菌属（其他），产志贺毒素大肠埃希菌血清型，艰难拟梭菌，弧菌属，气单胞菌属，类志贺邻单胞菌，小肠结肠炎耶尔森菌，产毒素、侵袭和致病大肠埃希菌，单核细胞增生李斯特菌，产气荚膜梭菌，蜡样芽胞杆菌
预先形成的毒素的摄入[b]	金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌
胃炎，胃和十二指肠溃疡	幽门螺杆菌
生殖道感染	
溃疡	梅毒螺旋体、杜克雷嗜血杆菌、沙眼衣原体（性病淋巴肉芽肿）、肉芽肿克雷伯菌
尿道炎	淋病奈瑟菌、沙眼衣原体、生殖支原体、解脲支原体、阴道毛滴虫
外阴阴道炎	青春期前的女孩淋病奈瑟菌和沙眼衣原体
细菌性阴道病	阴道厌氧菌过度生长
子宫颈炎	淋病奈瑟菌、沙眼衣原体
子宫内膜炎	肠杆菌科细菌、链球菌（A 群和 B 群）、肠球菌、混合厌氧菌属
输卵管炎，卵巢炎	淋病奈瑟菌、沙眼衣原体、混合需氧和厌氧微生物
盆腔脓肿	混合需氧和厌氧微生物
附睾炎	淋病奈瑟菌、沙眼衣原体、肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌、各种革兰阳性球菌
眼感染	
结膜炎	肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌、沙眼衣原体（包涵体结膜炎）、其他[c]
角膜炎	金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、铜绿假单胞菌、肠球菌、化脓链球菌（A 群）、肠杆菌科细菌、多杀巴斯德杆菌、凝固酶阴性葡萄球菌（术后）、痤疮丙酸杆菌（尤其是术后）、快速生长分枝杆菌、其他[d]
眼内炎	金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、痤疮丙酸杆菌、肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟菌、奴卡菌属
眶周蜂窝织炎	金黄色葡萄球菌、化脓链球菌（A 群）、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、梭状芽胞杆菌属
耳炎	
外耳道炎	金黄色葡萄球菌、化脓链球菌、铜绿假单胞菌、溶藻弧菌
中耳炎	肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌、金黄色葡萄球菌，罕见病原菌：革兰阴性杆菌、厌氧菌、需氧放线菌
呼吸道感染	
气管炎，气管插管的患者	肠杆菌科细菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、其他非发酵革兰阴性杆菌
社区获得性支气管炎	肺炎链球菌、流感嗜血杆菌（很少，其他嗜血杆菌）、卡他莫拉菌、金黄色葡萄球菌、肺炎衣原体、肺炎支原体、百日咳鲍特菌、化脓链球菌；不常见的，等同于医院获得性
医院获得性支气管炎	肠杆菌科细菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、其他非发酵革兰阴性杆菌；不常见的，等同于社区获得性
社区获得性肺炎	肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌、肺炎衣原体、肺炎支原体、嗜肺军团菌、奴卡菌属、多杀巴斯德杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、厌氧菌（吸入性）；不常见的，等同于医院获得性
医院获得性肺炎	肠杆菌科细菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、嗜肺军团菌、其他非发酵革兰阴性杆菌、吸入性（厌氧菌）；不常见的，等同于社区获得性
肺脓肿	金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、化脓链球菌、厌氧菌（吸入性肺炎）、奴卡菌属
脓胸	肺炎链球菌、厌氧菌、草绿色链球菌，特别是咽峡炎链球菌群、金黄色葡萄球菌、化脓链球菌、革兰阴性杆菌
骨髓炎	金黄色葡萄球菌、结核分枝杆菌、铜绿假单胞菌、依据感染部位的其他微生物
尿路感染	
前列腺炎	肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌、肠球菌

（续 表）

疾病	病原体
尿道综合征	同膀胱炎，但数量较少；沙眼衣原体和淋病奈瑟菌
膀胱炎	肠杆菌科细菌，特别是大肠埃希菌、肠球菌、腐生葡萄球菌（育龄妇女）、非发酵革兰阴性杆菌、解脲棒状杆菌（下尿道病变患者）
肾盂肾炎	肠杆菌科细菌、肠球菌、菌血症病原菌（下行感染），例如，金黄色葡萄球菌

注：[a] 细菌摄入引起的疾病，紧随组织侵袭，毒素产生，或其他致病机制；[b] 摄入预先形成的毒素引起的疾病；[c] 白喉棒杆菌、结核分枝杆菌、土拉热弗朗西丝菌、梅毒螺旋体、巴尔通体（猫抓）、多杀巴斯德杆菌、苏云金芽胞杆菌和结膜炎摩拉克菌；[d] 梅毒螺旋体、淋病奈瑟菌、莫拉菌属、白喉棒杆菌、芽胞杆菌属、厌氧菌和非结核分枝杆菌

获取标本前应该用无菌的、热的抹刀或熨斗消毒器官表面直到表面完全干燥。应该先采集体液，包括血液。对于血液采集，应该灼开心脏和大血管壁，然后插入大的无菌注射器针头（18～20 规格）。采集 20 ml 血液直接注入到血培养需氧瓶和厌氧瓶中。内脏的采集要从切开部位的中心迅速切下一块组织，样本连同申请单送到实验室，申请单上需要详细解释研究的目的。组织标本必须用实验室标准方法处理，包括革兰染色和培养。尸检培养的解释困难重重，但是对于检测那些不认为是人类正常菌群的病原菌很有用，例如，结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）、布鲁菌属（*Brucella* spp），某些系统性真菌，如组织胞浆菌（*Histoplasma capsulatum*）和粗球孢子菌（*C. immitis*）/波萨达斯球孢子菌（*C. posadasii*），寄生蠕虫及生物武器病原体。

（二）血培养

检测循环在血液中的细菌和真菌是微生物实验室的主要职能[49]。获得最理想血液样本的关键因素是通过充分消毒皮肤表面减少潜在污染。血培养污染率的最佳目标应该控制到＜3%[50]。避免通过静脉留置管采血，这种方式最有可能出现表面菌群的污染，其污染的比例要高于远端静脉采血的 2 倍[51]。多达 25%阳性血培养有可能是污染造成，进而关系到不必要的费用和滥用抗生素的危险[50]。常见的污染菌包括凝固酶阴性葡萄球菌、棒状杆菌（corynebacteria）、芽胞杆菌属（*Bacillus* spp.）及丙酸杆菌（propionibacteria）等。一般来讲，一次培养出这些细菌则代表污染，但重复多次分离出同一种细菌，则很有可能表明是有临床意义的菌血症。用氯己定-乙醇仔细消毒采血点是至关重要的，可以避免抽到这些污染菌[52]，对于不能使用氯己定消毒的患者，可以在乙醇消毒后使用碘酒或聚维酮碘消毒。所有的皮肤消毒剂在皮肤表面经过从湿到干的过程才具有杀菌活性，所以要在进针之前等待 30 s（氯己定和乙醇）和 1 min（聚维酮碘），这一步很重要。

在 2 个不同的部位分别采集两套血培养标本可以帮助实验室解释血培养结果，由皮肤共生微生物引起的真正脓毒症应该从 2 个采血部位都能检出。有些医院实验室有一套标准化程序，申请血培养要从 2 个不同的部位抽血，分别接种到至少 2 个培养瓶。如果使用 2 种培养基，则会提高微生物检出率。通常情况下，实验室选择一种需氧和一种厌氧肉汤培养。近期的研究表明拟杆菌属（*Bacteroides*）和梭菌属（*Clostridium* spp.）等厌氧菌引起的脓毒症比率在上升，未能检出厌氧菌会导致严重后果，因为经验用药不足以覆盖厌氧菌的感染[53]。

血培养采血总量是检出真正阳性患者的重要因素。对于成人来说，至少需要 40 ml 血液才能较为敏感地检出细菌[54]，这只占人体血液很小的比例。20 ml 和 30 ml 血液的检出率比 10 ml 血液检出率分别高出 29.8% 和 47.2%；40 ml 血液检出率要比 30 ml 血液高出 7.2%[54]。表 19-7 介绍了根据患者体重及总血量相应的百分比推荐的儿科患者血培养采血量。在申请血培养检查后，要尽快在用抗生素前抽取血液，如果有可能，所有的血液都在同一时间抽取（从不同的部位）。在大多数情况下，血培养的采集时机选择在患者发热至体温最高时，但是采集血液的总量比采集时间更为重要。这个结论已经被一个多中心的研究证实[55]。只有小于 30 岁患者组在高热后 1 h 抽取血培养有很小的优势，而在其他年龄组没有发现

表 19-7 儿科患者血培养推荐的血液体积[a]

患者体重[kg(lb)]	每套血培养推荐血液体积(ml)[b]	血培养套数	采集血液总体积(ml)	占患者血液总体积(ml)的百分比[b]
≤1(2.2)	2	1[c]	2	4
1.5～3.9(2.4～5)	2	2	4	4
2.1～12.7(5～28)	4(第一套);2(第二套)	2	6	3
12.8～36.3(28～80)	5	2	10	2.5
>36.3(80)	20	2	40	1.8～2.7

注:[a] 参考文献[4]修改;[b] 需氧和厌氧瓶;[c] 需氧瓶(在某些中心使用儿童瓶)

此优势。一般情况下,只有 10% 的阳性血培养标本是在患者体温最高的时候采集。

分离系统(isolator system)(如分解离心管)可用来检测苛养菌和用来检测在标准血培养肉汤培养基及标准培养条件下繁殖不好的细菌。如果常规工作中未使用市场上专用于检测真菌和结核分枝杆菌的培养基和培养条件,实验室应该储存一些用于分离系统的分离管和带盖子的离心机。因为白细胞溶解,细胞内的细菌释放,细菌能在培养基中更好地生长。接种含有细菌的沉淀物到不同的专用培养基上,可以提高阳性检出率。分离系统能够检测出的病原体包括:丝状真菌及双向型真菌[如镰刀菌(*Fusarium*)和组织胞浆菌(*Histoplasma capsulum*)]、一些酵母菌[接受抗真菌治疗患者的隐球菌(*Cryptococcus*)和酵母菌(*Yeasts*)]、巴尔通体(*Bartonella* species.)、脑膜炎奈瑟菌某些菌株、淋病奈瑟菌和其他一些苛养菌,这些病原体在常规血培养中很难生长,或不能产生足够的代谢物来触发自动血培养仪的检测系统[56]。直接将血液接种在选择性琼脂或孵育 4 天后盲传进行培养,这个方法与分离系统相比,能够更好地检出血培养中的军团菌(*Legionella*)[57]。当检测不常见的菌血症病原菌时,如土拉热弗朗西丝菌(*F. tularensi*)和巴尔通体属,使用分离系统的优点是能够接种一个小球到特殊培养基、进行菌落计数、报告每毫升血液中 CFU 数量。这个系统跟其他系统相比的缺点是对肺炎链球菌、其他链球菌、铜绿假单胞菌及厌氧菌的检出效果不好,以及处理过程中有增加污染的可能[58-59]。

对于自动血培养仪来说,标准的培养 5 天的方法,足以检出所有的常见病原菌及一些不常见的病原菌,如 HACEK 细菌群[嗜血杆菌属(*Haemophilus* spp.)、伴放线放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)、人心杆菌属(*Cardiobacterium hominis*)、侵蚀艾肯菌(*Eikenella corrodens*)及金氏菌属(*Kingella* spp.)],增加培养时间只会增加污染菌的数量[60-61]。所有血培养系统的抗凝剂都是聚茴香脑磺酸钠(SPS),SPS 对脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌、厌氧消化链球菌(*Peptostreptococcus anaerobius*)、念珠状链杆菌(*Streptococcus moniliformis*)及阴道加德纳菌(*Gardnerella vaginalis*)有抑制作用,如果采集血液的量和肉汤量的比例合适,能稀释 SPS,从而能减轻抑制作用[62]。

阳性血培养瓶首先进行涂片革兰染色检查,报告细菌形态及革兰染色特征。根据革兰染色观察到的细菌将阳性血培养转种到合适的培养基,一般情况下,这些平皿包括羊血平皿、巧克力平皿、麦康凯平皿和哥伦比亚萘啶酸平皿,因为 5%～10%的菌血症由多种细菌引起。如果革兰染色涂片中看到的细菌形态提示是厌氧菌,或细菌仅在厌氧瓶中生长,应该转种厌氧培养皿并在厌氧环境中培养。如果阳性报警瓶经革兰染色后没有发现细菌,则需要制第 2 张涂片,进行吖啶黄 DNA 染色[63]。如果发现细菌,即使细菌已经受到损害或没有细胞壁,也将会染成亮橙色,并且能够较容易识别。

使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS)数据库,通过质谱分析法,临床实验室已很容易鉴定从阳性血培养瓶中分离出的细菌[64-65]。还有一些核酸扩增和杂交的方法可以直接从阳性血培养瓶中检测细菌,并已经用于临床。这些方法显著缩短了结果报告时间,以及减少了有效的抗生素治疗时间、住院时间和住院费用[66-67]。关于快速分子和蛋白质组学方法的介绍详见第 4 章和第 7 章。

(三)中央静脉导管

采用传统的导管头培养方法来确定菌血症的来源是有争议的，因为等到培养结果出来时，导管尖端（如果是感染来源）已经拔掉[68]。导管尖端在血管内部分的外表取材最常用的培养办法是半定量方法，取 5 cm 导管尖末端，在血平皿上滚动 4 次[69]。大于 15 个菌落生长有意义，例如，若导管尖端与同时送检的血培养分离出相同的细菌，则提示导管尖端可能是菌血症的来源。如果没有同时送检的血培养的阳性报告，仅凭导管尖端培养解释其临床意义是不可能的。当怀疑导管部位感染时，可以吸取其新鲜的脓液培养。

有些实验室采用的方法是在不移除静脉留置管的情况下，来确定静脉留置管（常是中央静脉留置管）是否为菌血症的来源。其中一个方法是当留置管抽出的血液经过培养后，细菌量高于外周血细菌量 3 倍时，则确认为导管相关的菌血症。计数菌落形成单位太费力，一个替代的方法就是使用阳性报警时间的差别来得出结论，若仪器中导管血的报警时间比外周血报警时间早，且早于 2 h 时，说明是导管相关菌血症[69]。导管头表面培养的方法和阳性报警时间的方法对预测导管相关念珠菌血症不是特别有效[70]。

(四)脑脊液

经腰椎穿刺采集脑脊液是用来诊断脑膜炎（表 19-6）。与所有临床标本一样，即使是那些认为从无菌部位采集的标本，也偶尔会有污染菌生长。腰椎穿刺采集的第 1 管脑脊液，最有可能在操作过程中引入一些皮肤微生物，所以第 1 管脑脊液应该用于生化检测，第 2 管或第 3 管标本污染的可能性较小，应该用于微生物检测[71]。

尽管细菌染色和培养少至 0.5 ml 液体就可完成，但是最好送检量多一些，细菌量较少的标本在培养之前经离心浓缩后，会增加培养的敏感性。标本应该放在无菌容器里，室温条件下，立即送到实验室，最好是手工运送。当送检的脑脊液标本大于 1 ml 时，应使用细胞离心甩片机制备所有的涂片。接种 0.5 ml 脑脊液进行培养，或将脑脊液离心后（1500×g，15 min）接种 0.5 ml 沉淀重悬液进行培养[72]。接种的培养基依照表 19-5 的建议。尽管结核分枝杆菌检出率低，但仍建议送检大体积（7～10 ml）的 CSF 标本进行结核分枝杆菌的检测[73]。WHO 推荐使用核酸检测来诊断结核性脑膜炎，尽管这项检测未被 FDA 批准[74-75]。脑脊液中很少发现厌氧菌，即使是脑组织混合有厌氧菌的脓肿。痤疮丙酸杆菌可能是脑脊液分流留置管患者感染的原因，所以，建议分流液接种营养肉汤，至少培养 10 天[76-77]。

涂片应进行革兰染色，结果立即报告给医生。结果应包括对多核炎性细胞和细菌形态学的描述和半定量计数。如果结果提示是细菌群（例如链球菌和葡萄球菌），这也要跟临床沟通。因为直接抗原检测敏感性低，对患者有效的护理和治疗没有影响，所以不推荐直接使用抗原检测。需要注意的是，隐球菌抗原试验仍然很有价值。一种从 200 μl 脑脊液里同时检测 14 种细菌、病毒和酵母菌等病原体，并在大约 1 h 内完成的多重 PCR 检测已经上市使用（FilmArray ME panel; BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT）。但是分子检测不能用来代替细菌培养。钩端螺旋体（Leptospires）能在患者急性期最初 10 天的脑脊液里发现，脑脊液应该接种在 Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris 培养基内，建议的接种量是 0.5 ml，培养应在室温条件下孵育 13 周以上[78]。

(五)眼

多种标本类型可用于眼部感染的微生物学检查，包括：用拭子或无菌铲做结膜刮除获得结膜刮取物来诊断结膜炎、用无菌铲刮除角膜获得的角膜刮取物来诊断角膜炎、通过吸取玻璃体液来诊断眼内炎，以及吸取分泌的液体或组织活检来诊断眶周蜂窝织炎。存在于这些部位的病原菌在表 19-6 列出。因为从角膜刮除或玻璃体吸取的液体采集量很少，所以，建议在诊室或患者床边采集标本后直接接种培养皿和制备涂片。实验室和眼科医生之间应该有密切的工作联系，确保使用合适的培养基、正确的接种技术，并能快速将平皿和涂片运送到实验室。接种培养基时，可摩擦标本到培养皿的一小块区域或轻轻刮下无菌铲上刮取物到平皿表面，有时以小写“c”的形式。接种后的平皿常标记 OD（右眼）和 OS（左眼）后直接放到培养箱培养，实验室技术人员不要交叉划线。

检测常见病原体的培养基包括检测苛养菌的巧克力琼脂和大多数真菌培养基(表 19-5)[79]。如果眼科医生和微生物学家觉得合适并提出特殊申请,还应接种检测其他病原体(某些真菌、病毒及分枝杆菌等)的培养基。结膜刮取物的沙眼衣原体的核酸扩增试验(NAATs)是诊断包涵体结膜炎或沙眼可选择的试验,但是这项试验需要内部验证,对于眼部标本,还没有一种商业化试剂盒经FDA 批准[80]。如果眼部标本不能用沙眼衣原体NAAT,那用来培养的结膜刮取物和分泌物应该使用病毒/衣原体转运培养基转运(如 M4、M5 和 M6)(第 65 章)。

(六)耳

鼻咽培养结果对于检测中耳病原菌价值不大,不能用于中耳病原菌检测[81]。实验室经常会收到 2 类耳标本:诊断外耳炎的拭子标本和诊断中耳炎的中耳渗出液标本(表 19-6)。外耳和中耳这 2 个部位潜在的病原菌不一样[82]。中耳渗出液如果申请了厌氧菌培养,并正确抽吸采集了渗出液,且采用厌氧转运瓶运送,则应该进行厌氧菌培养。中耳渗出液直接涂片革兰染色对临床很有帮助,建议所有培养标本都做涂片染色检查。

外耳标本可以被皮肤或耳道的正常菌群污染。分离出凝固酶阴性葡萄球菌、类白喉棒杆菌(diphtheroids)和草绿色链球菌群等细菌可以被列出来作为鉴定的结果,但不列出药敏试验结果。实际上,金黄色葡萄球菌经常会从无感染的患者中被分离出来,所以炎症的出现可以用来帮助指导是否进行进一步的诊断检查。

(七)胃肠道

粪便标本常会送检到微生物实验室用来确定感染性腹泻的病原体。实际上,很多腹泻的原因不是细菌,而是病毒、寄生虫、免疫相关性疾病或其他因素。用来检测肠道病原菌的粪便应该采集到一个带盖的干净容器里,不能被尿、钡剂或卫生纸污染。因为肠道病原菌能被其他粪便细菌的代谢物所杀死,能很快酸化粪便,所以标本在采集后应放置到 Cary-Blair 转运培养基后迅速送往实验室。志贺菌(*Shigella*)最不稳定,经常在采集后 30 min 变得难培养。而对于霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*),使用其他转运培养基,如首选碱性蛋白胨水。一般不鼓励使用直肠拭子采集标本。然而,一种新型粪便采集工具似乎跟传统的粪便采集方法的效果相似,这种工具由植绒拭子放进 2 ml 改进的 Cary-Blair 培养基构成[83]。最近,使用不依赖培养的诊断性检测,例如,采用 NAATs 方法检测一系列粪便病原菌变得越来越普遍[84]。

所有的实验室应该进行标准化操作,以评估NAAT 检测和粪便培养申请的合适性。现已证实入院时没有腹泻的住院患者,不可能发生除了艰难拟梭菌以外的其他细菌引起的细菌性肠炎[17,85-87]。因为这个原因,住院超过 3 天的患者的粪便标本,没有患者的医生咨询或提出理由,不应该进行肠道病原菌检测。一个简单的规定是拒收住院超过 3 天的患者做常规细菌培养的粪便,并建议申请艰难拟梭菌检测,用于确定健康护理获得性腹泻。此外,艰难拟梭菌感染正快速扩展为社区获得性疾病,有时候是发生在出院后或者是门诊患者抗菌治疗后,有时候也发生在患者没有任何危险因素情况下。因此,不能拒绝门诊患者的艰难拟梭菌检测申请[86-87]。如果第 1 次NAATs 检测艰难拟梭菌阴性,则不允许常规做第 2 次重复试验,并且不宜使用 NAATs 方法进行疗效观察[87](第 55 章)。

大量的研究表明,不管是粪便白细胞检查还是乳铁蛋白检查,用于区分炎性腹泻和非炎性腹泻都不太有用[88]。鉴于这个原因,不能依赖任何粪便白细胞的检查试验确认是不是急性感染性腹泻。常见的胃肠道病原菌列于表 19-6[85]。当流行病学因素提示感染的可能性增加时,不常见的病原菌也应考虑在内。这就需要进行社区的定期调查以确定哪种病原菌是最常见的,特别是考虑到增加选择性培养基或毒性试验来常规检测弯曲菌属(*Campylobacters*),而不是检测空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)或大肠弯曲菌(*Campylobacter coli*)、弧菌属(*Vibrio* spp.)及小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)。使用 NAATs 检测能减少选择需求,但是在低流行背景下获得阳性结果应该谨慎解释。

选择性或鉴别性培养基可用于检测沙门菌属(*Salmonella*)和志贺菌属(表 19-5)。检测这些病原菌的培养基应包括:一个是鉴别而不是选择性培养基如麦康凯琼脂,另一个是弱选择性培养基如 Hektoen enteric(HE)琼脂或木糖赖氨酸脱氧

胆酸盐(XLD)琼脂。在某些情况下，还需要一个强选择性培养基如 salmonella-shigella(SS)琼脂。另外，增菌肉汤如革兰阴性肉汤或亚硒酸盐 F (selenite F)肉汤都能增加沙门菌的检出率，也推荐使用增菌肉汤用于检测某些人群(如食品加工者)的样本。增菌肉汤培养基主要用来分离沙门菌属，而不是是志贺菌属。分别传代培养 6～8 h 和 12～18 h 后的革兰阴性菌肉汤或亚硒酸盐 F 肉汤到弱的选择性和鉴别培养基，这样能防止正常菌群的生长和降低肉汤的作用[81]。所有的琼脂平皿置于 35～37 ℃，普通空气环境下孵育 2 天后，读结果。

空肠弯曲菌和大肠弯曲菌很难分离出来，要求使用专业培养基如弯曲菌琼脂含有 10% 的羊血和选择性抗菌药物[89]。培养基放置在 42 ℃，微需氧环境下含氮气(85%)、二氧化碳(10%)和氧气(5%)，培养 3 天。其他弯曲菌的检测需要不含抗生素的培养基，并在 37 ℃条件下培养。检测一些弯曲菌表面抗原的快速酶免疫测定(EIA)已被评价，它们已显示出很好的敏感性，但是阳性预测价值差，而且不能用于单独检测[85]。其他的非培养诊断性检测，如 NAATs，已被证实检测弯曲菌属有较好的敏感性和特异性，而且提供可同时、快速检测其他肠道病原菌的优势[84]。

1. 其他肠道病原菌 在某些地方或者流行病学需要情况下，医生需要申请弧菌属、小肠结肠炎耶尔森菌、气单胞菌属(*Aeromonas* spp.)和类志贺邻单胞菌(*Pleisomonas shigelloides*)等检查。在美国多数地区这些细菌感染的发生率很低，所以常规使用选择性培养基是不合适的。用于这些肠道病原菌的培养基包括检测弧菌的硫代硫酸盐枸橼酸盐胆汁酸盐蔗糖(thiosulfate-citrate bile salts-sucrose，TCBS)琼脂、检测小肠结肠炎耶尔森菌的头孢磺啶-氯氟苯脲-新生霉素(cefsulodin-irgasan-novobiocin，CIN)琼脂和显示是否溶血的血平皿或选择性血平皿，并提供一个用于气单胞菌属和类志贺邻单胞菌氧化酶试验的培养基(2 种菌都是氧化酶试验阳性)[85]。所有这些肠道病原菌都在常规培养基上生长，但是使用专性选择性培养基会简单一些并可提高检出率。

2. 产志贺毒素的大肠埃希菌 在美国不同的地区及世界其他地方，产志贺毒素的大肠埃希菌(STEC)的流行趋势差别很大。除了大肠埃希菌 O157:H7，还有其他的血清型参与。实际上，在美国约有 50% 产志贺毒素的大肠埃希菌不是 O157:H7 血清型，它们可能引起出血性结肠炎和溶血性尿毒症综合征[90-91]。EIAs、NAAT 组合和 PCR 方法可检测所有血清型的志贺毒素。CDC 建议所有检测 STEC 的粪便标本采用选择性培养基进行常规培养，采用营养肉汤(革兰阴性肉汤或者 MacConkey 肉汤)用于 EIA 试验[92]。来自 CDC 和美国公众健康实验室关于 STEC 检测有一个的规定，非 O157 型菌株建议送到公众健康实验室做进一步检测[93]。可以从美国公众健康实验室网站(http://www.aphl.org/AboutAPHL/publications/Documents/FS_2012April_Guidance-for-PHLs-Isolation-and-Characterization-of-Shiga-Toxin-Producing-Escherichia-coli-STEC-from-Clinical.pdf)下载指南。不管是山梨醇麦康凯琼脂，还是头孢克肟亚碲酸盐山梨醇麦康凯琼脂，或者显色培养基，都可以用来检测 O157 型菌株。需要注意的是，非 O157 型菌株不能用传统的办法检测出，如最近欧洲暴发的 O104 型[94]。

3. 直肠标本检测 VRE 或 β-溶血性链球菌 直肠拭子标本可用于鉴定 VRE 携带者和 A 群链球菌携带者，前者是为了感染控制，后者是为了院内感染的暴发调查或诊断儿童肛周感染[95]。直肠拭子或直肠周围拭子擦拭物培养可鉴定 VRE 携带者，如果采用分子学方法，直肠拭子要好些[96]。标本接种到选择性增菌肉汤如含有 6 μg 万古霉素/ml 肠球菌肉汤，或接种到含有 6 μg 万古霉素/ml 黏菌素-萘啶酸血平皿，或者是 VRE 显色平皿。*vanA* 和 *vanB* 2 种基因型菌株都可培养出，但需要进一步试验区分它们。事实上，*vanB* 基因同样存在于肠道中非肠球菌细菌里，使得检测 VRE 的新的分子诊断试验复杂化，当 PCR 结果阳性时，还需要确认 *vanB* 型肠球菌存在[96]。直肠拭子的培养用于识别 A 群链球菌携带者时，可使用羊血平皿或选择性链球菌琼脂平皿，后者常用于鉴定链球菌咽炎的患者。

4. 小肠细菌过度生长综合征 实验室偶尔会接收到申请用胃肠道标本做定量培养帮助诊断小肠细菌过度生长综合征，此病十二指肠和空肠内的微生物种类和数目增加，类似于结肠的数量(>10^5/ml)。目前，还不清楚哪种方法诊断小肠细菌过度生长综合征最佳[97]。实验室接收用无菌容器

送检的十二指肠和空肠吸取物。因为申请检查的目的是为了确定标本里的 CFU 数是高于还是低于 10^5 CFU/ml，最简单的方法是彻底振荡标本，然后用 0.001 ml 的接种环接种标本到血平皿上，然后像尿培养一样计数生长的菌落数即可。

(八)生殖器排泄物、渗出物和病变

生殖道细菌感染会出现很多不同的临床症状，包括女性的外阴阴道炎、细菌性阴道病、生殖器溃疡、尿道炎、子宫颈炎、子宫内膜炎、输卵管炎和卵巢脓肿，以及男性的尿道炎、附睾炎、前列腺炎和生殖器溃疡。表 19-6 列出了这些疾病和病原学。

很多标本都会有皮肤或黏膜正常菌群的污染。病原菌，如杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus-ducreyi*)、淋病奈瑟菌、阴道毛滴虫(*Trichomonas-vaginalis*)、梅毒螺旋体(*T. pallidum*)和沙眼衣原体都永远具有临床意义。其他的微生物如金黄色葡萄球菌、β-溶血性链球菌、肠杆菌科细菌或厌氧菌在某种临床条件下才是病原菌。根据标本的来源、比较潜在病原菌与定植菌群的相对数量，以及革兰染色结果解释等，都可以帮助技术员确定哪种细菌需要鉴定及做药敏试验。来自手术标本的分离菌应该鉴定和报告，例如，输卵管卵巢囊肿和睾丸附睾炎病例的标本；来自可能被正常菌群污染，且含有 PMNs 标本的纯培养或优势生长的潜在病原菌，也应该被鉴定和报告。多数情况下，厌氧菌混合感染在大多数情况下不要求被一一鉴定。实验室应该避免对所有标本的每一种分离菌株都进行分离、鉴定和药敏试验。

1. 淋病奈瑟菌和沙眼衣原体的检测 NAATs 方法更适合检测子宫颈内、阴道、尿道及尿标本中淋病奈瑟菌和沙眼衣原体。使用者应非常小心阅读所使用的试剂盒对于标本类型的要求，使用厂家推荐的操作步骤和装备采集标本。此外，已有报道有些试剂盒有假阳性和假阴性反应，特别是使用了未经验证的标本类型时，此时需要用其他试剂盒来确认[98]。

尽管眼、咽部和直肠标本商品化扩增系统都还没有经 FDA 批准，但是分子方法仍优于培养[99]。实际上，男性和女性自己采集拭子测试用于沙眼衣原体和淋病奈瑟菌的分子诊断至少与医护人员采集的效果一样[100-101]。目前，在某些行政管辖区，对于医疗法律案例，培养仍然是唯一可以被接受的诊断方法，但是由于沙眼衣原体培养的敏感性低，NAAT 方法应该常被用于医疗决策[4]。

当标本直接在医生的办公室接种在选择培养基上，如改良 Thayer-Martin 培养基，并能立即孵育时，培养淋病奈瑟菌是最佳的方法。拭子标本应该置于含 Stuart 或 Amies 培养基的转运系统，并尽快送往实验室，避免使用棉拭子，因为它们可能对于淋病奈瑟菌有毒性，一些新的转运产品已被证明能提高淋病奈瑟菌存活能力[102]。淋病奈瑟菌培养的标本在转运中应冷藏保存[102]。随着转运时间的延长，培养的检出率也在逐渐降低。转运时间超过 24 h 的标本不能接收。

2. 细菌性阴道病 细菌性阴道病发生在含有多种厌氧菌的阴道微生物菌群过度生长的条件下，包括阴道加德纳菌(*G. vaginalis*)、弯杆菌属(*Mobiluncus*)和拟杆菌属(*Bacteroides*)[103]。最好用革兰染色和标准化评分系统来诊断细菌性阴道病，如 Nugent 评分[104]。不推荐使用常规阴道培养来诊断 BV，因为阴道加德纳菌是阴道微生物菌群的一部分。有一种 DNA 探针分析方法(Affirm VPⅢ 鉴定试验；Becton Dickinson, Sparks, MD)已经上市用于同时检测念珠菌属、阴道毛滴虫和阴道加德纳菌[105]。BDMax 阴道炎检测试剂盒(Becton Dickinson, Sparks, MD)是一种新型的 FDA 认证的多重 PCR 方法，用来诊断 BV、滴虫病和阴道念珠菌病，这种方法是基于阴道细菌和乳酸杆菌比例的一种特殊定量算法。

3. B 群链球菌筛查 分娩前定植在妊娠妇女阴道或直肠的 B 群链球菌，在分娩时会增加新生儿感染的风险。目前，推荐对妊娠 35～37 周的孕妇行阴道和直肠拭子采集，拭子放在转运培养基中(Amies 或 Stuart)转运，将标本置于增菌肉汤如 LIM 肉汤中培养[106]。肉汤在 35℃条件下培养 18～24 h，转种到血琼脂平皿，平皿应放置至 48 h 以排除 B 群链球菌。NAATs 检测 B 群链球菌有相当或更高的敏感性，并已经上市使用，但是在检测前仍需要在 LIM 肉汤里培养至少 18 h 以获得最佳敏感性。当 NAATs 未使用 LIM 增菌肉汤或者是分娩期护理时检测 GBS，敏感性比较低[107-108]。使用 NAATs 检测非浓缩样本的敏感性范围为 62.5%～98.5%，浓缩样本范围为 92.5%～100%[106]。

4. 杜克雷嗜血杆菌(*H. ducreyi*) 如果怀疑杜克雷嗜血杆菌的感染，采集溃疡底部的标本，在标本处理之前放置于室温保存[109]。用一根拭子涂片做革兰染色。如果发现许多小的、多形的革兰阴性杆菌或球杆菌，成链状或成团排列（“鱼群”），则表明是杜克雷嗜血杆菌，但是一般很少看见。分离此菌需要在营养丰富的培养基中孵育，比如GC琼脂。采用分子诊断方法可对溃疡疾病做出更好的诊断。更多详细内容见第38章。

5. 放线菌属(*Actinomyces* spp.) 放线菌属如衣氏放线菌(*A. israelii*)，会引起使用宫内避孕装置(IUD)的女性发生盆腔炎[110]（第54章）。宫内避孕装置培养应该放入一个无菌的液体培养基（最好简化，如巯基乙酸盐）并振荡，然后将液体培养基接种到需氧和厌氧培养基。附着在宫内避孕装置上的炎性碎片和组织应该移除下来，并进行需氧和厌氧培养。放线菌属会产生细菌丝缠绕形成的小结（称谷粒或颗粒），直径大概1 mm或更长。这些颗粒应该在玻片上碾碎后做革兰染色，然后转到培养基培养。如果出现分枝的、革兰阳性细丝，则表明这个临床部位有放线菌，培养后确认诊断。

(九)下呼吸道

下呼吸道标本是用来确定气道疾病包括气管炎和支气管炎、肺炎、肺脓肿及脓胸的病原体[111]。常见的送检标本类型包括：痰（咳痰和诱导痰）、气管内吸取物、支气管毛刷、洗液、肺泡灌洗液（盲采或支气管镜检过程中采集）和胸腔积液。标本应该迅速送到实验室并立即处理，不能延误，理想情况是采集后1 h内，以保证苛养菌存活，如肺炎链球菌。如果不能立即送检，标本应该冷藏保存。在这种情况下，肺炎链球菌尿抗原检测可能更敏感，但是由于上呼吸道菌群定植，这种方法对于儿童来说特异性差[112]。

在感染背景下的下呼吸道分泌物常含有急性炎症细胞，如PMNs。大量上皮细胞表明被上呼吸道的定植菌群污染，因为上皮细胞存在于口咽部而不是下呼吸道。为避免细菌检查和报告口咽部微生物群而不是下呼吸道的微生物，应该制定一个规定来筛查和拒收严重污染的痰标本。最常见的方法是直接革兰染色评价标本里上皮细胞的数量[113-114]，上皮细胞数量的增加（定义为＞25个上皮细胞/10倍物镜下）表示严重污染口咽部物质，这些标本应该拒收。其他的筛选方法考虑到PNMs和上皮细胞的相对量，根据炎症和污染的比例来确定标本接收还是拒收，这种方法对于免疫力低下的病人需要谨慎[115]。其他的方法包括巴特利特分级系统和默里和华盛顿提出的系统[116-117]，不必筛查用于检测结核分枝杆菌的呼吸道标本，因为对于检测这些微生物，所有的代表下呼吸道的标本都被认为是可以接收的[118]。呼吸道标本培养包括一个革兰阴性菌选择性培养基，如麦康凯琼脂、羊血琼脂、黏菌素-萘啶酸琼脂和用于检测嗜血杆菌属的巧克力琼脂。培养皿应该置于35 ℃，在含有3%～5% CO_2 的温箱中培养48 h。诊断军团病最好培养或者尿抗原检测。

下呼吸道标本的特殊考虑如下。

1. 军团菌(*Legionella*)(军团菌病) 鉴于嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)培养的困难性，尿抗原检测常被推荐是诊断军团菌可供选择的方法[119]。然而，诊断军团菌更倾向于使用培养的方法（特别是使用支气管肺泡灌洗液），因为它能检测所有的军团菌种或血清型，而尿抗原检测只能检测嗜肺军团菌血清型1型[120]。使用污染的标本（如痰标本）培养军团菌，首先要对标本去污染，去污染的方法是在接种前用酸处理标本并使用专用培养基[121]。酸处理的具体步骤是将标本1∶10稀释于KCl-HCl缓冲液中(pH 2.2)，室温下孵育4 min。孵育时间不能超过4 min，因为超过4 min后军团菌本身也会被酸杀死，这点非常重要。标本接种在含有或不含有抗生素（如万古霉素、多黏菌素B和茴香霉素）的活性炭酵母浸液(BCYE)琼脂中[121]。在35 ℃，湿润环境下至少培养5天。NAATs检测军团菌具有很好的敏感性和特异性，尽管目前还没有商品化的试剂[122]。

2. 经支气管镜检查采集的标本 怀疑肺炎的支气管肺泡灌洗液和保护性毛刷(PSB)标本应该做定量培养来评估潜在病原菌的意义[123]。当采集支气管毛刷标本，毛刷应该放于1 ml的非抑菌无菌盐水或乳酸林格液中，后一种液体较少抑制军团菌属。微生物实验室应在收到标本后迅速处理。在实验室，支气管肺泡灌洗液和PSB标本置于振荡器上振荡，使用离心甩片机制备涂片用于革兰染色，用移液管或定量接种环取0.01 ml的

标本接种于合适的培养基上。如果要培养厌氧菌(只对于 PSB 标本),可以使用碎肉或是厌氧巯基乙酸盐培养基。支气管镜灌洗标本应该在革兰染色和接种到培养基前充分震荡。应该对革兰染色的标本进行 PMNs 和上皮细胞的计数,用来报告培养标本的质量,但是报告的结果不能作为标本拒收的标准。

3. 肺囊性纤维化患者标本(第 45 章) 来自肺囊性纤维化患者的呼吸道标本需要接种更多的培养基,来检测这些患者独特的重要病原菌[124]。送检做培养的标本包括痰、吸取物、深咽部拭子。洋葱伯克霍尔德菌复合群(*Burkholderia cepacian* complex)的检测需要额外的选择性培养基,包括洋葱伯克霍尔德菌选择性培养基和氧化发酵型多黏菌素 B 杆菌肽乳糖琼脂等,还有提高金黄色葡萄球菌的检出的甘露醇盐琼脂或金黄色葡萄球菌显色琼脂平皿,以及提高丝状真菌检出的抑制霉菌的琼脂[125-126]。洋葱伯克霍尔德菌选择性培养基也用于这些肺囊性纤维化患者的快生长分枝杆菌的检出[127]。

(十)上呼吸道

上呼吸道标本包括外鼻(用于 MRSA 检测)、鼻咽、咽喉、口腔溃疡和鼻窦的炎性标本。尽管这些部位很少发生严重疾病,但是很多病原菌可定植或持续存在于这些部位,而在深部及不易进入的部位引起有症状感染[128]。A 群链球菌(GAS)检测诊断咽炎是上呼吸道标本最常见的检查申请。如果仅做 A 群链球菌检测,咽拭子可以干燥转运,并可使用干燥剂保持干燥。如果转运时间超过数小时,则要冷藏保存。培养 A 群溶血链球菌的最适宜的培养基可使用马血、羊血琼脂或选择性链球菌琼脂,选择性链球菌琼脂通过抑制其他口腔微生物的生长,使生长的微生物更易读取,但是会延迟化脓链球菌菌落的出现。温度 35 ℃,培养 48 h,在 5%CO_2 的环境下培养,也可以放在普通空气但是要多次刺穿培养基表面。因为 GAS 快速抗原检测试剂盒的敏感性差及链球菌后遗症的风险,快速检测结果阴性的儿科患者,还需要进行培养[129]。如有必要需要采集 2 份咽拭子培养。如果只收集到一份咽拭子,则应该先接种平皿培养。成人患者如果快速检测结果阴性,检测结果不再需要培养证实[129]。使用快速 PCR 检测检查 GAS 咽炎大约需要 15 min,此试剂已经上市使用[130-131]。这些快速 PCR 检测试剂跟传统培养的敏感性相当,≥97%,阴性结果可能不需要其他检测进一步证实。

C 群或 G 群链球菌、坏死梭杆菌(*Fusobacterium necrophorum*)、溶血隐秘杆菌(*Arcanobacterium haemolyticum*)、淋病奈瑟菌、白喉棒杆菌(*C. diphtheriae*)、支原体(mycoplasmas)和衣原体(chlamydias)有时能引起咽炎。咽拭子的厌氧菌培养对于检测坏死梭杆菌(*F. necrophorum*)是有必要的。一只标准的拭子标本已够用,拭子标本应该置于含有 Amies 或改良的 Stuart 培养基的转运装置[132]。分离淋病奈瑟菌(*N. gonorrhoeae*),标本应该立即接种到选择性培养基,如改良的 Thayer-Martin 琼脂。NAATs 因其具有较高的敏感性,同样是检测咽喉部淋病奈瑟菌的一种选择,尽管目前还没有被 FDA 批准,因此使用这些试验需要实验室验证[101]。

鼻咽部标本一般只用来检测百日咳的病原菌。NAAT 方法是检测百日咳鲍特菌(*B. pertussis*)和副百日咳鲍特菌(*Bordetella parapertussis*)最敏感的方法,许多 FDA 认证的试剂盒已经商品化使用[133-134]。检测鲍特菌属,使用小尖头的涤纶拭子采集标本最合适,棉拭子或者人造纤维拭子可能对百日咳有毒性。患百日咳 2 周后,细菌培养的敏感性明显降低,建议一旦怀疑鲍特菌暴发,首先要做培养[135]。

鼻窦的炎性物质应该培养以寻找引起鼻窦炎的病原体。几乎所有的细菌性鼻窦炎都继发于上呼吸道病毒感染。细菌聚集在鼻窦内引起鼻窦内上皮衬细胞破坏、炎症及肿胀狭窄或鼻口关闭,阻止了正常的排泄功能[136]。标本最好由耳鼻喉科的医生在内镜检查过程中采集,因为是从感染的鼻窦里直接采集的样本,可避免被鼻道里的正常菌群污染。吸取物、灌洗液、刮屑/清创物和活检标本都应该保持湿润并放在无菌容器里送至实验室。所有的标本需要做需氧培养,慢性鼻窦炎需要厌氧环境转运和厌氧培养。尽管内镜检查获得的拭子标本与吸取物标本对于检出细菌的一致性很好,但是真菌检出率低,真菌是慢性鼻窦炎的病原体[137]。

(十一)组织活检样本

来源于无菌部位的组织标本通常是在外科

手术中获得，并且手术中应该采集足够量的标本用于所有可能的检测，包括组织病理学和各种微生物学检查。1 cm^3 或 1 g 的组织标本可以满足微生物学检查。但是这个量对于针吸组织或活检组织就比较困难，因为常常吸出的组织特别小。组织一般都是用无菌容器运输，为了避免干燥，应尽快送检。为了保湿，特别小块的组织标本可以放在一个方形的用非抑菌生理盐水润湿的无菌纱布里。如果要求做厌氧菌培养，那么组织应该用一支厌氧转运管或厌氧转运瓶运送，有些可以保持很好的厌氧环境，即便在过夜运送过程中。因为厌氧转运瓶可视作为通用的转运装置，同一块组织也可以用于其他微生物检验。大块的组织标本，尽管是简单的有氧运输，但是氧气不断减少。在这种情况下无氧运输没有必要，即使无厌氧转运，大块标本也可以用于厌氧培养。

一旦实验室接收到组织标本，在研磨（或者切碎用作真菌培养）前应该选择明显感染部位的组织做革兰染色或培养。一般认为组织标本是未被外界或体腔内的细菌污染的标本，但是有时也会发生污染。普通的皮肤共生菌（如凝固酶阴性葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌）能非常缓慢地引起人工关节和骨的慢性感染，有时在安装人工假体数年以后才出现症状[43]。有一个方法可以帮助实验室区别皮肤共生菌污染和真正的感染，特别推荐给人工关节修复手术，方法是在同一个手术部位不同的区域采集至少 3 块，最好是 5 块人工假体手术的组织标本。如果来自同一个手术部位的 2 块或更多的组织生长相同的细菌，那么这个细菌有可能是关节的病原菌而非污染菌[7-8]。

一些引起组织感染的细菌不能用标准的微生物培养基在体外培养出来。包括梅毒螺旋体（*T. pallidum*）引起的梅毒的各期组织、肉芽肿克雷伯菌（*Klebsiella granulomatis*）[肉芽肿荚膜杆菌（*Calymmatobacterium granulomatis*）]引起的腹股沟肉芽肿、小螺菌（*Spirillum minus*）引起的鼠咬热和其他的病原体。这些微生物可以通过组织病理学染色发现。新的分子生物学技术已证实比较可靠，特别是对于引起生殖器溃疡和形成生物膜的微生物[138-139]。使用 DNA 测序来鉴定组织切片中看到的细菌，包括惠普尔养障体（*Tropheryma whipplei*）、伯内特柯克斯体（*Coxiella burnetii*）、汉氏巴尔通体（*Bartonella henselae*）已经得到广泛的认可[41,140]。

来自创伤伤口或烧伤的组织应做定量培养，如果定量检测结果≥10^5 CFU/g，则可预示有可能进展为创伤相关脓毒症[141]。该方法的局限性包括：结果缺少重复性；与组织学检查相比，预测值低。全层钻孔活组织检查标本采集后做定量培养。定量培养时，首先将一部分标本称重并在生理盐水中研磨均匀。将盐水混悬液做系列稀释后培养。组织定量培养的详细步骤请参考其他出处[142]。

1. 骨髓转运和培养　虽然骨髓抽取物培养有助于发现播散性真菌感染和分枝杆菌感染疾病，但是对大部分细菌性感染帮助不大[143-144]。在一些移植中心，送检骨髓抽取物做细菌培养是一种常规操作，抽取物放在裂解离心管（分离管）和无菌容器里送检。无菌容器接收的骨髓抽取物应该转到血培养瓶中，在自动血培养仪器中培养。如果做了骨髓培养，骨髓吸出物直接的革兰染色没有太多帮助，也不应作为常规细菌培养的组成部分。

2. 淋巴结　送到实验室的淋巴结抽吸物和活检样本经常是做非细菌感染的病原体检查。但是，来自分枝杆菌感染、猫抓病、鼠疫、布鲁菌病、兔热病的患者淋巴结检查都很有效。在进行组织标本的初步处理和平皿培养操作时，不管是否有菌落生长，都应该格外小心并做好生物安全防护。平皿应该封好，不能意外打开。

3. 坏死性筋膜炎　坏死性筋膜炎和气性坏疽（肌坏死）都是医疗急诊，需要立即诊断和治疗，包括抗菌药物治疗和手术清创[145]。坏死性筋膜炎和气性坏疽常常是由产毒的化脓链球菌、其他 β-溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌、梭菌属、需养和厌氧菌混合感染引起的[141]。革兰染色涂片通常能看见坏死细胞的碎片、罕见或极少的 PMNs（因为细胞溶解）和病原菌，应该通过培养确认病原。

4. 蜂窝织炎　很多研究表明从蜂窝织炎边缘采集的抽吸物不是很好。先注射非抑菌生理盐水随后抽吸，可以获得足量的标本进行培养[146]。在最佳条件下，这些标本不太可能出现阳性，蜂窝织炎患者血液培养也不太可能出现阳性[147]。如果微生物检测对于一个迅速进展的坏死病变至关重要，则可能需要组织活检标本。

5. 胎盘 为了确定早产的病原学或产科医生怀疑患者有感染时，会送检胎盘做微生物检测。从羊膜下的绒毛膜层采集一小块组织标本，放置在厌氧转运瓶内运送。如果实验室收到的是完整的胎盘，用无菌剪刀剪开胎盘最上层的羊膜，然后用无菌镊子把上层羊膜移开，露出下面的绒毛膜层，用无菌手术刀或者是另外一把无菌剪刀切下一块新鲜的暴露出的绒毛膜组织用来做需氧和厌氧培养，有时还可以切下一块放入 2SP 或 SP4 转运培养基中用来做支原体和脲原体(*Ureaplasma*)培养。分子方法还没有产生[148]。

(十二)泌尿道

泌尿道疾病包括前列腺炎、尿道综合征、膀胱炎和肾盂肾炎。表 19-6 总结了病原体。尿、前列腺分泌物、尿道标本可用来诊断这些疾病。可以采集中段尿(清洁)、导尿管尿(直接的/留置管)、通过膀胱内镜或者耻骨上吸引术采集的尿，耻骨上吸取尿应该像无菌体液一样对待。不应该送检及接收导尿管尖头及婴儿口袋尿标本进行培养[28]，尿培养是大多数微生物实验室最常见的检测，5%～40% 的尿培养物检测出有污染，尿污染的定义是无尿路感染(UTI)的尿标本有皮肤共生菌、阴道或粪便的微生物生长。虽然关于如何采集尿可以减少污染一直存在争议，但仍推荐在采集中段尿之前进行传统的皮肤清洁，提供正确采集尿标本的书面说明有助于降低污染率[149]。不正确的尿标本采集、储存及转运到实验室将导致不准确的或误导性的培养结果。因此，尿标本应该采集后 30 min 内处理，如果不能及时送检，则标本要冷藏保存，但不能超过 24 h，如果不能及时送检，也可储存在含硼酸的转运管，室温条件下保存 24 h[4]。

因为大多数尿培养结果都是阴性，所以在开发筛查方法确定是否需要做尿培养方面做出了巨大的努力。通过革兰染色筛选尿标本快速，但工作量大并需要熟练的技术人员。油镜下(100×物镜)每个视野看到 1～2 个或更多的相似形态的细菌，相当于培养计数 100 000 个细菌或更多[150]。尿分析(UA)检测白细胞酯酶和亚硝酸盐，此方法快速、便宜并且操作简单，但是在某些患者中敏感性和特异性低[151]。此方法假阴性结果有多种原因：频繁排尿稀释了尿中的白细胞酯酶，肠球菌和其他较少见的尿道病原菌不产生硝酸盐还原酶[152]。UA 筛选方法与细菌数≥10^5 CFU/ml 的标本一致性较好，但是用于菌落数较少的标本就比较差。另外，UA 检测阳性不能区分无症状细菌尿和真正的细菌感染。对门诊患者尿筛查还是建议根据 UA 筛查结果来确定尿标本是否培养，这种筛选用于有症状的患者、糖尿病患者以及超过 60 岁的老年女性效果最好[152]。最近，经证实一种基于光散射方法的新型快速尿培养筛查具有高敏感性和阴性预测值，可减少 58% 的接种培养[153]。研究的热点一直在寻找一种准确、经济、敏感及特异的自动尿筛查系统，以此来消除采用尿培养结果来判断是不是尿路感染(UTI)的指标。

尿细菌定量培养的标准做法是用校准过的塑料或金属环接种 0.01 ml 或 0.001 ml 的标本到合适的培养基上，通常是接种到羊血和麦康凯琼脂平皿。接种环垂直插入充分混匀的尿中，刚刚没过环即可。将接种环上的尿在琼脂表面，从上到下划一直线，然后垂直于此线再从上到下来回划线，使接种环的尿量遍布整个琼脂平皿表面。在平皿接种之前，要保证覆盖在接种环上的尿膜不含有气泡，以免改变标准的接种量。尿培养在 35 ℃，不含 CO_2 的培养箱孵育 24 h。值得注意的是，最近的一些研究发现，斯氏放线棒菌(*Actinobaculum schaalii*)，一种触酶阴性、多形态的革兰阳性球杆菌，是儿科患者和老年患者(超过 60 岁)引起尿路感染(UTI)的主要病原体，此菌需要厌氧培养或 CO_2 环境下培养生长[154]。

(十三)伤口

表面伤口标本经常使用拭子标本送检，经常有各种细菌生长，包括共生微生物，这给医生解释结果和治疗时造成困惑。虽然表面拭子容易采集，但不鼓励送检这样的样本。如果必须送检拭子标本，则要求送检双头拭子或植绒拭子，还必须有转运培养基系统[24-26]。一项 meta 分析检测了跟传统深部培养比较下肢拭子的有效性，结果发现拭子的敏感性只有 49%，特异性为 62%，阳性似然比是 1.1，阴性似然比是 0.67[155]。一般情况下，活检标本、溃疡刮除物和抽吸物更适合送检[156]。标本应该置于无菌容器里，于 2 h 内在室温下送至实验室，以防止损失苛养菌及污染菌的

过度生长。

所有能做革兰染色标本都要做革兰染色，革兰染色能够帮助解释培养结果。革兰染色涂片出现优势细菌的形态、急性炎症细胞（PMNs）、细胞内细菌、细胞坏死等，则表明是一个优质的标本[157]，过多的上皮细胞则表明有皮肤菌群的污染。当标本有严重污染时可停止对分离菌株的进一步检测。

参考文献请扫二维码查阅

第20章 试剂、染色、培养基：细菌学

RONALD ATLAS，JAMES SNYDER

（褚云卓 译；刘文恩、倪语星 审校）

一、试剂

一些经典和快速的试验用于鉴定临床上重要的细菌。下面简要说明在临床微生物学中经常应用的试验和试剂。关于这些试验和使用的试剂的更详细的说明见参考文献[1-4]。

（一）生化试验

1. 乙酰胺水解试验（奈斯勒试剂） 奈斯勒试剂用于测定乙酰胺的水解，该试验用于鉴别某些革兰阴性细菌。样本接种于含乙酰胺的琼脂平板皿或肉汤后，在35～37℃孵育，直到菌落形成或混浊后，将1滴奈斯勒试剂加入1 ml肉汤中或直接加在琼脂平皿上，以形成红褐色的沉淀物为阳性反应。奈斯勒试剂制备：将1 g氯化汞加入6 ml蒸馏水，然后滴加2或3滴浓盐酸以溶解沉淀物。另取2.5 g碘化钾溶于6 ml蒸馏水后，加入氯化汞溶液中。接着取6 g氢氧化钾溶于6 ml蒸馏水并加入到氯化汞-碘化溶液中，随后再加13 ml蒸馏水。溶液应用玻璃漏斗过滤（不是Nalgene过滤器）。奈斯勒试剂存储在阴暗处可使用数周。在使用该溶液前应检查是否有分解（除黄色外，出现任何颜色改变表示有分解，应准备新鲜的溶液）。奈斯勒试剂被吞食、吸入或通过皮肤吸收都是有毒的，具有神经危害，可能为致癌物质，并具有生殖危害；且具有腐蚀性，可导致灼伤。

2. L-丙氨酸-7-酰胺基-4-甲基香豆素（Gram-Sure） L-丙氨酸-7-酰胺基-4-甲基香豆素是一种荧光化合物，用于辅助革兰染色，以区分革兰阴性和革兰阳性需氧杆菌或球杆菌。它是来自Remel（Thermo Fisher Scientific，Lenexa，KS）浸有Gram-Sure试剂的纸片。这种快速的纸片试验最常用于革兰阳性菌，可能出现革兰染色不定或革兰染色阴性，如芽胞杆菌属或乳杆菌属。试验的原理是依赖于存在于革兰阴性菌细胞壁的氨肽酶，它能水解从非荧光底物到蓝色荧光化合物纸片上的L-丙氨酸-7-酰胺基-4-甲基香豆素。过夜生长的纯菌落接种到去离子水中，然后再接种到纸片上，纸片在室温孵育5～10 min，然后在长波紫外光下观察蓝色荧光。蓝色荧光指示为革兰阴性细菌，没有蓝光表示为革兰阳性细菌。专性厌氧菌可能无法取得预期的结果[5]。

3. 碱性磷酸酶 碱性磷酸酶能够通过水解无色含磷酸盐的化合物而显色，例如，使对硝基苯酚磷酸盐变为黄色的硝基苯酚；酚酞磷酸盐变成酚酞，后者在碱性条件下变为红色；或使吲哚磷酸盐变成蓝色的靛蓝。这个试验用于鉴别葡萄菌属，已整合到一些商业化鉴定系统产品中。

4. 精氨酸芳胺酶（L-精氨酸-4-甲氧基-β-萘） 精氨酸芳胺酶常作为诊断试验包含在一些商业化的鉴定系统中，例如，biomérieux（Durham，NC）的API鉴定系统。这个试验的作用底物是L-精氨酸-4-甲氧基-β-萘。阴性是无色的，阳性则变成橙色。用于区别葡萄球菌和其他细菌。

5. 精氨酸双水解酶 精氨酸双水解酶检测：将浓的菌悬液（麦氏浊度标准4～5）接种到加1%精氨酸的默勒（Moeller）肉汤中。接种后，培养液用石蜡油覆盖，由于氨的产生导致的碱性用pH指示剂检测，阳性结果是紫色，结果可于4～48 h读取。

6. 联苯胺试验（盐酸联苯胺） 联苯胺试验用于鉴别凝固酶阴性葡萄球菌。该试验包含在多个商业鉴定系统中。联苯胺试验是基于卟啉铁化合物的存在。取1 g的盐酸联苯胺盐溶于20 ml冰

醋酸、30 ml 水和 50 ml 95% 乙醇溶液中，然后加入 5%过氧化氢溶液，形成针对革兰阳性菌的蓝绿色至深蓝色的溶液。

7. 胆汁溶解试验(脱氧胆酸) 胆汁溶解试验用于假设性鉴定肺炎链球菌。这个试验的关键试剂是脱氧胆酸钠，是一种具有表面活性的胆盐。该试验可在试管内或琼脂平板上的 α-溶血链球菌菌落上进行的。直接加几滴 10%脱氧胆酸钠溶液到菌落的表面，然后将琼脂平板在 35℃下孵育 30 min。肺炎链球菌溶解，而草绿色链球菌不溶解。另外，制备浓的生理盐水(pH 7.0)菌悬液，并分装 2 个试管。一支试管加入 10%脱氧胆酸钠溶液，另一支试管加入无菌生理盐水。将试管于 35℃孵育后，肉眼比较结果。如果细菌能溶于胆汁，含有脱氧胆酸的试管将 15 min 内呈现浊度降低，随黏度增加而溶液变澄清。

8. CAMP 试验(β-溶血素) CAMP 试验基于 β-溶血性链球菌形成的能够增强溶血区域的物质(CAMP 因子)，用于鉴定 B 群 β-溶血性链球菌。哈迪诊断(Hardy Diagnostics，Santa Maria，CA)的 CAMP 斑点试验(CAMP spot test)试剂被用作快速 CAMP 测试方法。该试剂含有葡萄球菌 β-溶血素(也称为 β-毒素、β-溶血素或 β-葡萄球菌溶血素)直接作用于被扩散到可疑菌落周围的培养基中的 CAMP 因子。β-溶血素与 CAMP 因子产生协同效应，增强绵羊红细胞的溶血。增强溶血将可在 30 min 至 1 h 内观察结果，做法是在已分离的 β-溶血链球菌菌落旁加入一滴 CAMP 斑点试验试剂。

9. 触酶试验(过氧化氢) 过氧化氢用于检测细菌产生触酶。浓度 15%的过氧化氢用于鉴别不产生过氧化氢的厌氧菌。浓度 30%的过氧化氢用来检测奈瑟菌属。选取菌落上的细菌到干净的载玻片上，并添加一滴过氧化氢。产生气泡为阳性反应。必须避免血液，因为红细胞能产生触酶，可导致假阳性反应。另外，也可在不含血液的平板或斜面的菌落上直接加 1 滴过氧化氢，立即产生气泡为阳性反应。

10. 凝固酶试验(兔血浆) 含有 EDTA 的脱水兔血浆用于检测由葡萄菌属产生的游离或结合(凝集因子)凝固酶。检测由路邓葡萄球菌和施氏葡萄球菌产生的结合凝固酶时，使用人血浆更好，但不常规使用，因为人血浆可能含有葡萄球菌抗体。将浓的菌悬液加到干净的载玻片上，并混合 1 滴蒸馏水。如果没有自凝，则可加入 1 滴兔血浆悬浮液，并以圆周运动方式摇晃混合，形成可见的白色团块表明存在结合凝固酶，应进行阴性和阳性对照。

该试验也可在试管中操作，可检测结合和游离性 2 种凝固酶。加入一个接种环的被测菌至含有 0.5 ml 兔血浆的无菌试管中。在 35℃孵育 4 h，应在前 4 h 内观察凝固，因为葡萄球菌能产生溶纤维剂溶解凝固块。如果没有观察到凝固，该试管应在室温下孵育并过夜，再次观察延迟形成的凝固块。

11. 脱羧酶试验 溴甲酚紫是用来检测赖氨酸、鸟氨酸和精氨酸其中任何一种氨基酸脱羧引起的 pH 变化。脱羧酶试验可用于鉴别肠杆菌科。对于脱羧酶试验，中性或略酸性 pH 肉汤含有单独一个待测的氨基酸，大多数情况下至少孵育 24 h。肉汤可以含有溴甲酚紫或加入一滴溴甲酚紫到生长后培养基中，以确定 pH 值是否碱性。已有关于更快速的试验[6]，可从培养基去除葡萄糖，以 pH 5.5 为起始。溴甲酚紫从黄色变为紫色为阳性结果。

12. 七叶苷水解(枸橼酸铁铵) 使用 1%枸橼酸铁铵溶液检测七叶苷水解至七叶内酯，孵育含七叶苷的培养基 1～2 天后，加入数滴枸橼酸铁铵溶液，立即形成棕黑色表示阳性反应。七叶苷水解也可使用七叶苷琼脂测定，过夜培养后琼脂发黑。

13. β-半乳糖苷酶[邻硝基苯-β-D-半乳糖苷(ONPG)] 浓度为 4mg/ml 的 ONPG 用于检测 β-半乳糖苷的活性。这种酶促进碳源的利用，如乳糖裂解成一分子葡萄糖和一分子半乳糖，使细胞可以产生分解代谢并生长。ONPG 代替乳糖，当用 β-半乳糖苷酶裂解 ONPG 时释放邻硝基苯酚。此化合物为黄色。这个试验特别用于对肠杆菌科成员的鉴别。ONPG 浸润的片剂可以用于本试验。

14. β-葡糖醛酸酶[对硝基苯基-β-D 葡萄糖苷，4-甲基苯基酮-β-D-葡糖醛酸(MUG)] 检测 β-葡糖醛酸糖苷酶的活性，可以使用比色底物(对硝基苯基-β-D-葡萄糖苷)或荧光底物(MUG)。该试剂用于快速鉴定大肠埃希菌、咽峡炎链球菌族成员和其他细菌。比色试验：0.1%(质量体积百

分浓度)对硝基苯基-β-D 葡萄糖苷(比色底物)溶于 0.067 mol/L 索伦森磷酸盐缓冲液(pH 8.0)中。接种 1 菌环经过夜培养的细菌于 0.5 ml 上述底物溶液中,将试管置于 35℃孵育 4 h 后,检测外观是否为黄色(释放出对硝基苯)。在荧光试验中,底物 MUG 产生的产物是在长波紫外光下显蓝色荧光的 4-甲基苯基酮。正常情况下 MUG 试验是用于假设性鉴定大肠埃希菌,最近用于链球菌菌株鉴定。准备 MUG 荧光试验:溶解 50 mg MUG 在 10 ml 0.05 mol/L pH 7.5 索伦森磷酸盐缓冲液。以 1:16 稀释 MUG 原液后,添加 1.25 ml 到含有 50 张无菌纸片的小瓶中。让纸片彻底浸泡,直到没有液体留在小瓶中。铺开饱和的纸片,并完全干燥。该纸片放于暗色瓶中,可以在 −20℃下贮存 1 年,或在 4℃下贮存 1 个月。用 1 滴无菌水湿润纸片,用木棒或接种环将细菌接种到纸片上,然后在 35℃孵育纸片 2 h。用长波紫外光照射纸片,阳性反应显示为蓝色荧光。

15. 马尿酸盐水解(茚三酮试剂氯化铁) 马尿酸盐水解为苯甲酸和甘氨酸,用于 B 群链球菌(GBS)、某些李斯特菌、阴道加德纳菌、空肠弯曲菌和嗜肺军团菌等的鉴定。茚三酮试剂可用于检测生成的甘氨酸。茚三酮试剂(3.5%)制备:将 3.5 g 茚三酮加至 50.0 ml 丙酮和 50.0 ml 正丁醇中。茚三酮试剂在室温下暗处贮存。用 0.067 mol/L 的索伦森磷酸盐缓冲液(pH 6.4)制备 1%(质量体积百分浓度)的马尿酸钠溶液,在含 0.5 ml 该溶液的试管中接种细菌,在 35℃培养 2 h,之后加入 0.2 ml 茚三酮试剂。在 5 min 内显深蓝紫色表示为阳性反应。

对于嗜肺军团菌检测,在 0.5 ml 1%马尿酸钠溶液中接种 1 个菌环量的细菌,在 35℃空气环境下孵育 18~20 h,然后加入 0.2 ml 茚三酮的试剂溶液。细菌和茚三酮混合后在 35℃孵育 10 min。观察该混合物 20 min,蓝紫色表示阳性反应。氯化铁也可以用来检测马尿酸盐水解,将氯化铁试剂(12 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 加入 100.0 ml 的 2%盐酸中)加到接种后的肉汤中[例如,心浸液肉汤或托德-休伊特肉汤(Todd-Hewitt broth)],再添加马尿酸,生成不溶性的苯甲酸铁盐棕色沉淀物,表明为阳性水解反应。

16. 吲哚试验[Ehrlich 试剂、Kovács 试剂、对-二甲氨基肉桂醛(DMACA)] 吲哚试验用于检测由色氨酸酶脱氨后的色氨酸产物。可以用埃里希试剂、Kovács 试剂或 DMACA 来检测该反应。准备埃里希试剂,加 1 g 对-二甲氨基肉桂醛到 95 ml 的 95%乙醇中。然后慢慢加入 10 ml 浓盐酸。使用埃里希试剂时,先加入 1 ml 二甲苯到培养 48 h 的蛋白胨肉汤或其他含色氨酸的肉汤培养基中提取吲哚。大力摇试管 20 s,再静置 1~2 min,让二甲苯萃取物在肉汤顶部,缓缓向试管的一侧加入 0.5 ml 的埃里希试剂。不要摇晃试管。5 min 内在培养基和试剂交界面有红色圈表示阳性。

对于产生少量引哚的微生物如非发酵菌和厌氧菌,埃里希试剂更好。准备 Kovács 试剂吲哚,加 10 g 对-二甲氨基肉桂醛至 150 ml 戊醇或异戊醇中。然后加入 50ml 浓盐酸。加入 5 滴 Kovács 试剂到培养 48 h 的 2%蛋白胨肉汤或 18~24 h 的色氨酸肉汤培养物。加入后不要动摇试管。培养液表面呈现红色表示结果呈阳性。

对于圆点吲哚试验,加 2 ml 浓盐酸到 18 ml 蒸馏水中。待混合物冷却,然后加入 200 mg DMACA,用 2 滴试剂湿润一块惠特曼(Whatman)3 号滤纸。用无菌接种环或木棒取血琼脂平板上培养了 18~24 h 的菌落,涂抹到湿润滤纸上。2 min 内观察颜色转为蓝色至蓝绿色,表明为阳性,没有颜色变化或粉红色,表明为阴性。这项测试仅用于含有足够色氨酸和不含葡萄糖的培养基上的菌落。从含有染料的培养基[例如,麦康凯或伊红亚甲蓝(EMB)琼脂]取出的菌落可能会导致错误的结果,因此不应使用。也不应该使用混合菌落,因为吲哚阳性菌可能会导致吲哚阴性菌落出现弱阳性。

17. 亮氨酸氨基肽酶(LAP)试验(亮氨酸萘胺) LAP 试验用于检测亮氨酸氨基肽酶(LAP)的存在。底物亮氨酸萘胺通过 LAP 水解成亮氨酸和游离萘胺。LAP 有助于触酶阴性的革兰阳性球菌(链球菌、肠球菌和链球菌样细菌)的假设性鉴定。肺炎链球菌、化脓链球菌、片球菌、乳球菌和肠球菌属都是 LAP 阳性的,而其他 β-溶血性链球菌 LAP 阴性。纸片浸润了亮氨酸-β-萘胺或亮氨酸-α-萘胺,经由 LAP 阳性的细菌产生的 LAP 酶水解。结果释放出 β-萘胺,再与 DMACA 试剂(Dalynn RP95)结合,形成明显的红色。操作此试验时,将 LAP 纸片无菌操作放在无菌培养皿中,放置至室温后。用少量的水湿润纸片,从过夜培

养物中取几个菌落。室温下孵育 5 min。滴加 1 滴 DMACA 后，在 1 min 内观察结果。红色或粉红色表示结果为阳性。

18. 溶菌酶试验(溶菌酶)　溶菌酶试验是测定细菌在有溶菌酶存在的情况下的生长能力，例如诺卡菌属。制备试剂：将 50 mg 溶菌酶加在 50 ml 的 0.01 N 盐酸中。该溶液无菌过滤后冷藏贮存可长达一周。溶菌酶试验：加 5 ml 溶菌酶溶液到 95 ml 甘油基础肉汤中(蛋白胨 1 g，牛肉膏 0.6 g，甘油 14.0 ml，蒸馏水 200 ml)。分装每瓶 5 ml，并冷藏。比较被测试的细菌在添加溶菌酶甘油肉汤的生长与未添加的甘油肉汤的结果。

19. 硝酸盐还原试验(N,N-二甲基萘胺与对氨基苯磺酸)　硝酸盐还原试验用于测定细菌还原硝酸盐为亚硝酸盐或游离氮气的能力。该试验用到两种试剂。试剂 B 是 0.6 ml *N*,*N*-二甲基萘胺加入 100 ml 5 mol/L 乙酸中。试剂 A 是将 0.8 g 磺胺酸加至 100 ml 5 mol/L 乙酸中。这些试剂冷藏贮存在黑暗环境中。试验操作：取 0.05 ml 试剂 A 加到 10 滴过夜培养的硝酸盐肉汤中，然后孵育 5～10 min，再加入 0.05 ml 试剂 B，然后再在暗室中孵育 5～10 min(注：在第 9 版手册中，试剂 A 和 B 可以被混合和加在一起，但这样降低了试验的敏感性)。试剂 A 和 B 加入后，如果培养基几分钟后转为红色或紫-洋红色时，该微生物可被报告为硝酸盐阳性，这表明该微生物具有还原硝酸盐成为亚硝酸盐的能力。但加入 2 种试剂后没有红色或紫色生成，并不意味着微生物不能还原硝酸盐。菌株可能还原硝酸盐为亚硝酸盐，然后亚硝酸盐完全还原成含氮的气体，因此加入试剂 A 和 B 后不能检测到亚硝酸盐。如果在加入对氨基苯磺酸和萘胺后培养基不变色，加入少量锌粉到培养基中，锌粉会催化硝酸盐还原成亚硝酸盐。因此，如果硝酸盐没有被微生物还原，即硝酸盐阴性，则会被锌粉还原，然后在 15 min 孵育后转为红色。如果培养基在加入锌粉后没有颜色改变，说明微生物不仅具有还原硝酸盐为亚硝酸盐的能力，而且还能还原亚硝酸盐为含氮气体；这些微生物也表现为硝酸盐还原试验阳性。

20. 氧化酶试验(TMPD/DMPD)　微生物学中氧化酶试验用来确定细菌是否产生特定的细胞色素 c 氧化酶[7]。该试验利用纸片浸润试剂，例如四甲基对苯二胺二盐酸盐(TMPD)或 *N*,*N*-二甲基对苯二胺二盐酸盐(DMPD)，这也是一种氧化还原指示剂。TMPD 比 DMPD 更敏感，因此通常优先选择。该试剂氧化时是深蓝色或枣红色的，还原时无色。改良氧化酶试验用于鉴别微球菌及相关细菌和其他大多数需氧革兰阳性球菌，使用的试剂是 6%的 TMPD(在 Kovács 氧化酶试剂中使用相同的化学试剂)溶于二甲基亚砜，试剂避光保存。从血琼脂平皿上把菌落涂到滤纸上，然后将试剂滴到滤纸上，在 2 min 内变为蓝到紫蓝色的表示阳性反应。

21. 苯丙氨酸脱氨酶试验(三氯化铁)　三氯化铁用来检测苯丙氨酸脱氨酶的作用。12 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 加入到 100.0 ml 2%盐酸中。盐酸制备：加 5.4 ml 浓盐酸(37%)至 94.6 ml 蒸馏水中。苯丙氨酸脱氨酶试验的操作：加入 4 或 5 滴三氯化铁试剂到含有苯丙氨酸琼脂或过夜生长的菌液肉汤中。培养基中出现褐色表明为阳性反应。

22. 吡咯烷酮芳胺酶活性(PYR 试验)　吡咯烷酮芳胺酶(pyrrolidonyl arylamidase，PyR)又称吡咯烷酮芳胺酶(pyrrolidonyl aminopeptidase)，是一种基于吡咯烷酮芳胺酶的酶活性用于某些细菌组假设性鉴定的快速比色法。本试验用于鉴定革兰阳性球菌和非发酵性革兰阴性细菌。该反应需要添加对-二甲氨基肉桂醛(DMACA)，将其加入 2.5 ml 十二烷基硫酸钠中，加 2.5 ml 冰乙酸，然后加 5.0 ml 2-甲氧基乙醇和 90 ml 蒸馏水(贮存在 4℃及避光容器中)。此外，还有一种商业试剂盒是将 L-焦谷氨酸 β-萘胺浸润到纸片上，作为底物检测吡咯烷酮芳胺酶，水解底物产生 β-萘胺，它与 PYR 试剂(DMACA)结合后形成明亮的粉红色或樱桃红色。PYR 试验阳性用于假设性鉴定 A 群链球菌(化脓链球菌)和 D 群肠球菌。

23. 脲酶试验(酚红)　脲酶试验用于测试微生物利用脲酶分解尿素的能力。分解后生成的氨导致 pH 升高，指示剂酚红在碱性条件下变为粉红色(pH 8.4)。细菌在含有尿素的培养基上培养，例如克里斯坦森尿素琼脂。虽然许多肠道细菌可水解尿素，但只有少数"快速脲酶阳性"的微生物可快速分解尿素(<4 h)，例如，变形杆菌。尿素肉汤用于快速检测脲酶阳性的微生物。限制营养素再加上使用 pH 缓冲液能够让快速脲酶阳

性的微生物能够产生足够的氨，使酚红变为粉色，而其他细菌则不能。快速脲酶试验也用于幽门螺杆菌的诊断，通过检测胃黏膜上活检采集的细胞来检测幽门螺杆菌。用于进行脲酶试验的培养基的制备：在基础肉汤中加入以下混合溶液 10.4 ml，混合溶液为 20%（质量体积百分浓度）的尿素水溶液，其中含有 0.1 g KH_2PO_4、0.1 g 的 K_2HPO_4 溶液和 0.5 ml 1∶500 的酚红，调节 pH 至 6.8，定容至 100 ml。配制 1∶500 酚红，溶解 0.2 g 酚红至氢氧化钠中，并加蒸馏水至 100 ml。在 4 h 内的转为红色表明有脲酶活性。

24. 伏-波（Voges-Proskauer，VP）试验（α-萘酚/KOH） VP 试验用于检测由某些细菌在蛋白胨-葡萄糖肉汤缓冲液（甲基红-VP 肉汤）生长过程中产生的乙偶姻（乙酰基甲基甲醇）。VP 试验常用于属间的鉴别（如大肠埃希菌与克雷伯菌和肠杆菌属的鉴别）和肠杆菌科细菌的鉴别。该试验可以作 为其他细菌菌群（草绿色链球菌）鉴别试验。该试验使用 5%的 α-萘酚，配制方法是将 5 g 萘酚加入 100 ml 无水乙醇和 40%KOH（将 40 g 氢氧化钾溶在 100 ml 蒸馏水中）中。试验操作是将待测菌接种在甲基红-VP 肉汤中，并培养直至获得良好的生长，然后将 0.6 ml α-萘酚溶液和 0.2 ml 40% KOH 加入到 2.5 ml 培养肉汤中。5 min 内形成粉红色或红色表明为阳性反应。15 min 内不显色考虑为阴性。

（二）缓冲液

1. 牛血清白蛋白组分Ⅴ 分枝杆菌检测的标本用 *N*-乙酰基-L-半胱氨酸氢氧化钠去污后，再加 0.2%牛血清白蛋白组分Ⅴ溶液起缓冲作用。该溶液的制备是将 40.0 ml 的 5%牛白蛋白、8.5 g 氯化钠和 960.0 ml 蒸馏水混合，用 4%的 NaOH 调节 pH 至 6.8，用过滤法将溶液灭菌后冷藏保存，加入缓冲液前，样品用 NALC-NaOH 除去污染然后离心浓缩，沉淀的样品悬浮于 1～2 ml 的无菌 0.2%牛血清白蛋白的溶液。处理后的标本可用显微镜检查或接种到培养基中。

2. 甘氨酸缓冲盐水 甘氨酸缓冲盐水[0.043 mol/L 甘氨酸，0.15 mol/L NaCl（pH 9.0）]用于一些血清学试验，也可用作肠道微生物的运输介质。制备方法是将 3.22 g 甘氨酸和 8.77 g NaCl 溶解在 1 L 的蒸馏水中。

3. 磷酸盐缓冲盐水 磷酸盐缓冲盐水溶液的配制是根据 pH 的要求混合不同量的 0.1 mol/L 的一价和二价磷酸盐和 0.85%NaCl。通常准备成 10×原液。制备 0.1 mol/L 的 NaH_2PO_4（磷酸二氢钠）溶液，将 13.9 g 的 NaH_2PO_4 溶解在 1 L 去离子水中；制备 0.1 mol/L 的 Na_2HPO_4（磷酸氢二钠）溶液，将 26.8 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 溶解在 1 L 去离子水中；制备 8.5%的 NaCl（氯化钠）溶液，将 85.0 g NaCl 溶解在 1 L 去离子水中。高压灭菌 20 min 或进行过滤，冷藏贮存。制备磷酸盐缓冲盐水应用液，在 100 ml 8.5%的 NaCl 中加入适当量的 10×原液的一和二元磷酸盐溶液，然后加蒸馏水或去离子水使体积达到 1 L。

4. Sorenson 酸碱缓冲剂 制备 Sorenson 酸碱缓冲剂是将适量的 0.067 mol/L 磷酸氢二钠与 0.067 mol/L 磷酸二氢钾进行混合。制备 0.067 mol/L 磷酸氢二钠，将 9.464 g 无水磷酸氢二钠溶解在 1 L 的蒸馏水中。制备 0.067 mol/L 磷酸二氢钾，将 9.073 g 无水磷酸二氢钾溶解在 1 L 的蒸馏水中。

（三）去污剂

1. *N*-乙酰-L-半胱氨酸氢氧化钠（NALC-NaOH） NALC（黏液溶解剂）-NaOH（去污剂）用于处理分枝杆菌的标本。该试剂由 50.0 ml 无菌 4%氢氧化钠、50.0 ml 2.9%枸橼酸钠和 0.5 g NALC 组成。枸橼酸钠用于稳定乙酰半胱氨酸。该试剂应制备后 24 h 内使用。

2. 氯化十六烷吡啶-氯化钠（CPC-NaCl） CPC-NaCl 用于进行分枝杆菌培养的痰标本运送前的去污处理。制备是将 1 g CPC 和 2 g 氯化钠溶在 100 ml 蒸馏水中。它可以在室温下贮存在密封的棕色瓶中。如果有结晶形成，使用该溶液前应轻微加热。痰和 CPC-NaCl 等量混合直到样本被液化，然后可将标本运送到检测地点。标本经 CPC-NaCl 处理后必须培养在鸡蛋为基础的培养基上，否则残余的 CPC 将抑制分枝杆菌生长。

3. 草酸 草酸用作培养分枝杆菌的标本中含有假单胞菌属时的去污剂。该试剂特别有用于囊性纤维化患者的呼吸道标本。制备该溶液，将 50 g 草酸加入 1.0 L 蒸馏水中。将溶液在 121℃下高压灭菌 15 min，使之可以在室温下贮存长达 1 年。

(四)染料和指示剂

多种染料和指示剂用于检测特定反应如 pH 和氧的产生。常用的染料和 pH 指示剂见表 20-1。

表 20-1　染料和 pH 指示剂

指示剂	pH 和颜色
酸性品红(Andrade's)	5.0,粉红
	8.0,淡黄
溴甲酚绿	3.8,黄
	5.4,蓝
溴甲酚紫	5.2,黄
	6.8,紫
溴酚蓝	3.0,黄
	4.6,蓝
溴百里酚蓝	6.0,黄
	7.6,深蓝
氯甲酚绿	4.0,黄
	5.6,蓝
氯酚红	5.0,黄色
	6.6,红
甲酚肽	8.2,无色
	9.8,红
间甲酚紫	7.4,黄
	9.0,紫
甲酚红	7.2,黄
	8.8,紫
甲基红	4.4,红
	6.2,黄
中性红	6.8,红
	8.0,黄
酚酞	8.3,无色
	10.0,红
酚红	6.8,黄
	8.4,红
刃天青	氧化:蓝,无荧光
	还原:红,有荧光
百里酚蓝	8.0,黄
	9.6,蓝
氯化三苯基四氮唑	氧化:无色
	还原:红

(五)防腐剂

脱脂牛奶　脱脂牛奶是用来稳定细菌悬浮液,特别是冷冻那些含有厌氧菌的悬浮液。脱脂牛奶的制备是将 20 g 脱脂奶粉加到 100 ml 蒸馏水中。脱脂奶粉溶解于水中后,将溶液分装 0.25～0.50 ml 于 2 ml 的小瓶中。脱脂牛奶 110℃下高压灭菌 10 min。可冷藏长达 6 个月。

(六)麦氏浊度标准

麦氏浊度标准用来作为调整细菌悬浮液浊度的参考,使细菌数在一个标定的范围之内。利用氯化钡制备麦氏浊度标准,也可使用乳胶珠。制备麦氏浊度标准,在螺旋盖试管中混合指定量的 1%无水氯化钡(氯化钡)和 1%(体积百分比浓度)冷纯硫酸(H_2SO_4),封紧试管。当硫酸钡摇匀后,试管的浊度大约相当于细菌悬浮液的浊度。在室温下避光环境中贮存标准液试管。利用分光光度计,使用 1 cm 的光路,测 0.5 麦氏浊度标准在 625 nm 的吸光度应该是 0.08～0.10。标准液应定期使用光密度计检测。没有关于检查频率的要求。然而,当放在密度计后无法读取指定范围时,应视为不可使用。生产自动鉴定/药敏试验系统的公司会提供指南,制造商负责麦氏浊度标准的准确性和可靠性的检测,每个生产批号应该提供质量控制记录。

二、染色

显微镜检查有助于鉴定临床上重要的标本。涂片可来自有关的组织和体液标本。如果有足够量的细菌,涂片可以用组织标本直接涂抹或加一滴体液(例如,痰)到一个干净的载玻片上。细胞离心机可用于浓缩细胞[8-10],标本用加热法或甲醇固定到载玻片上。首选甲醇固定,因为加热会产生伪影,也可能会产生气溶胶,并且标本可能不会在载玻片上充分附着。可用各种染色方法从标本中检出细菌。以下是一些常用的染色程序。

1. 亚甲蓝染色　亚甲蓝染色用于观察细菌形态。这种染色用于观察引起口腔感染(樊尚咽峡炎)的梭形杆菌和樊尚螺旋体的形态,也可以用于确定细胞内微生物如奈瑟菌的位置。亚甲蓝色染色可鉴别白喉的异染颗粒,但应该小心染色过度,因为这会弱化细菌和颗粒之间的差异。亚甲蓝将生物体或白细胞染成深蓝色,与浅灰色的背景相对比。白喉棒杆菌染成蓝色,异染颗粒染成明显

的深蓝色。应用亚甲蓝染可疑白喉棒杆菌异染颗粒时，用 0.5%～1.0%亚甲蓝溶液染 30～60 s，最多染 10 min，将载玻片用水冲洗，吸干，并在 100×到 1000×放大倍数光学显微镜下观察。

2. 麦克法迪恩（M′Fadyean）染色 M′Fadyean 染色是改良的亚甲蓝染色，用于检测临床标本中炭疽芽胞杆菌。制备染色液：将每毫升 0.05 mg 亚甲蓝溶解在 20 mmol/L 磷酸钾中，调节至 pH 7.3。载玻片染色 1 min，然后洗涤。为保证安全，用 10%次氯酸盐溶液洗载玻片。干燥载玻片后用光学显微镜检查。具有毒力的炭疽棒状杆菌周围出现淡红色胶囊现象（M′Fadyean 反应）。

3. 革兰染色 革兰染色最常用于细菌镜检。该操作首先由 Hans Christian Joachim 所描述。根据染色反应细菌被分为：革兰阳性菌，它保留了结晶紫染料，并出现深蓝色或紫色；革兰阴性细菌，因为初染液可被脱色，被番红（沙黄）染液复染后出现红色或粉红色。染色反应反映了细菌细胞壁基本结构的差异，也与抗菌药物的敏感性及鉴定相关。革兰染色适合于大部分细菌，但不适合细菌太小或缺乏细胞壁的微生物，如梅毒螺旋体、支原体、衣原体和立克次体[11]。分枝杆菌通常不用革兰染色，然而，重度感染时涂片会显示出串珠样，类似诺卡菌，或可能出现“鬼影”[11]。厌氧菌、陈旧培养物和受抗菌药物作用影响的微生物的染色结果可能特别难以解释。

大多数临床实验室使用常规革兰染色时，载玻片首先用初步染料结晶紫覆盖（10 g 90%染料溶在 500 ml 无水甲醇中），至少 15 s 后，载玻片用水洗涤再用媒染碘覆盖（6 g 碘和 12 g 碘化钾溶在 1800 ml 水中），这增加了初步染色与细菌细胞的亲和力。将载玻片用丙酮醇脱色 15 s 后用水冲洗（400 ml 丙酮溶于 1200 ml 95%乙醇中）。脱色剂将革兰阴性细菌的初染脱掉。革兰阳性细菌细胞保留初步染色。将载玻片立即洗涤并用番红（沙黄）复染至少 15 s（10 g 染料溶在 1 L 蒸馏水或去离子水中）。洗净这张载玻片，然后吸干，并在光学显微镜 1000×放大倍数下观察。

对于弗朗西丝菌、军团菌、布鲁菌属等，由于其菌体微小，传统的革兰染色很难见到或者染色微弱，替代染色可使染色增强而被观察到。在革兰染色利用碱性品红作为番红替代染液已成功用于观察土拉弗朗西丝菌；直接荧光抗体测定法更敏感，虽然它不经常在临床微生物学实验室使用；吉曼尼兹（Gimenez）染色可以替代革兰染色观察军团菌属，这个染色是很难制备的，没有商业试剂可购，每次使用之前需要过滤，存储并不稳定；与土拉弗朗西丝菌一样，革兰染色的复染液用碱性品红替换番红更容易观察布鲁菌。

4. 芽胞染色 维-康芽胞染色（Wirtz-Conklin spore stain）是一种用于检测芽胞的鉴别染色。芽胞染色对鉴定芽胞杆菌和梭菌属非常有用。使用此方法，芽胞染成绿色而其余菌体染成粉红色，没有芽胞形成的细菌是粉红色的。芽胞染色程序，将载玻片覆盖于 5%～10%的孔雀石绿水溶液，染色 45 min，或者轻轻加热载玻片到出现蒸汽 3～6 min。加热能提高芽胞摄取染料的能力。然后用水冲洗载玻片，番红水溶液（0.5%）复染 30 s，洗净载玻片，然后吸干，并用光学显微镜 1000×检查。

5. 魏森（Wayson）染色 Wayson 染色可用于证明鼠疫耶尔森菌双极染色的特性，但在临床微生物实验室并不常用。现在流感嗜血杆菌脑膜炎的发病率有所下降，所以它不再用于筛查脑脊液细菌。配制染色试剂：0.2 g 碱性品红溶于 10 ml 95%乙醇溶液中，0.75 g 亚甲蓝溶于 10 ml 95%的乙醇溶液中，将 2 种溶液一起缓慢加入 200 ml 5%苯酚水溶液中。将染料过滤并在室温下储存在不透明的瓶内。加上述染料 1 min，然后冲洗载玻片，吸干，并用 1000×放大倍光学显微镜检查。

6. Gimenez 染色 Gimenez 染色用于细胞培养中立克次体、考克斯体属和嗜肺军团菌的镜检。碳酸品红是初步染色，再用快绿和孔雀石绿色复染，背景和微生物有较大的反差能更易观察微生物。染色液必须在使用前 48 h 加热并过滤。

7. 抗酸染色 抗酸染色用于鉴定分枝杆菌、诺卡菌、红球菌、Tsukamurella（冢村菌）、戈登菌和麦氏军团菌。这些细菌有长链脂肪酸（分枝菌酸），使它们难以用结晶紫等碱性染料染色。

分枝杆菌细长、稍弯曲、棒状或可见较暗似串珠样的小颗粒。结核分枝杆菌可出现串珠状平行排列线或“线”棒；堪萨斯分枝杆菌可形成长的、常为宽大、带状菌体；鸟分枝杆菌复合菌出现短的、染色均匀球杆菌。诺卡菌通常有分枝并总是表现出斑点的外观。抗酸染色已经发展了许多相关的染色操作方法。

齐-内染色(Z-N)法，载玻片在70℃下热固定2 h。然后将载玻片浸在碳酸品红溶液(0.3 g碱性品红溶于10 ml 95%乙醇，加入5 ml碳酸和95 ml水；溶液在使用前过滤)中。载玻片在60℃下缓慢加热直到出现蒸汽，维持3～5 min，冷却后，将载玻片用水洗后用酸化酒精(3 ml盐酸加在97 ml 95%乙醇中)脱色，再用亚甲蓝(0.3g染料溶于100 ml水中)复染20～30 s。抗酸微生物会染成红色，细胞背景和其他细菌将是蓝色，即复染的颜色。

在改良Kinyoun的抗酸染色方法中，碳酸品红染色不用加热，而在初染时用较高浓度的碳酸，初染液将4 g品红溶于20 ml 95%乙醇中，加8 g碳酸和100 ml蒸馏水。齐-内染色法和Kinyoun染色具有相同的敏感性和特异性；然而，Kinyoun(冷染)染色过程耗时较少且更容易操作。

抗酸染色另一改良方法是使用较弱的脱色剂(0.5%～1.0%硫酸)代替3%的盐酸酒精。这个特别的染色方法有助于区分那些已知的部分抗酸或弱抗酸菌，特别是诺卡菌属、红球菌属、冢村菌、戈登菌和迪茨菌等微生物。这些微生物不能被齐-内染色法或Kinyoun很好地染色。

年龄、药物暴露和抗酸微生物本身等因素可能影响抗酸染色结果，如结核分枝杆菌始终是抗酸的(在齐-内染色或Kinyoun染色时)，而快速生长的分枝杆菌和诺卡菌则不是，因此，这些微生物可能需要通过使用改良Kinyoun染色。组织标本用其他的改良染色，如Fite-Faraco染色和Pottz染色，不常见的菌株如麻风分枝杆菌可优先选用。

临床标本中少量抗酸微生物的检出是相当有意义的。然而，利用成人胃液检测肺部疾病或HIV阳性患者粪便标本诊断鸟胞分枝杆菌感染抗酸染色特异性非常差(腐生菌假阳性干扰)，敏感性也较差。此外，接受了足够疗程治疗的患者，涂片仍然可能为阳性，但培养可能在几周以后转为阴性。

8. 吖啶橙染色 吖啶橙是一种可以嵌入天然和变性状态的核酸里的荧光染料。吖啶橙染色用于一些其他感染上，如棘阿米巴感染、传染性角膜炎和幽门螺杆菌胃炎[12]。此外，当血培养细菌革兰染色结果是可疑的或难以解释时，它可以用来确认细菌存在，尤其是当怀疑存在细菌，但用光学显微镜未能检测到时。吖啶橙染色程序是在载玻片上覆盖吖啶橙溶液[原液：将1 g染料溶在100 ml水中；应用液：取0.5 ml原液加入5 ml 0.2 mol/L；醋酸缓冲液(pH为4.0)]，载玻片通过紫外荧光显微镜检测。联合使用荧光染色和吖啶橙染色也可以鉴别血培养阳性标本中的革兰阳性和革兰阴性菌[13]。

9. 金胺-罗丹明染色 金胺和罗丹明是非特异性荧光染料，与分枝菌酸结合，对脱色用的酸性酒精有抗性。荧光染色程序与品红抗酸染色的程序等效[14]。抗酸微生物在黑色背景下发出橙黄色荧光。如果不用二次染色，生物体发出黄绿荧光。在此过程中，载玻片在65℃下热固定至少2 h。然后将其用金胺-罗丹明染液(1.5 g金胺O，0.75 g罗丹明B，75 ml甘油，10 ml苯酚和50 ml水)染色15 min，再用水冲洗，随后用溶在70%乙醇的0.5% HCl脱色2～3 min，冲洗后，将载玻片用0.5%高锰酸钾复染2～4 min，冲洗载玻片，干燥后在紫外荧光显微镜下镜检。

10. 免疫荧光抗体染色 免疫荧光染色用荧光染料标记抗体，使标记的抗体与特异性抗原发生反应，并在荧光显微镜下观察细菌的染色[15-16]。这种方法能根据该抗体的特异性反应鉴定特定细菌的种类和亚型，例如军团菌属。主要用于确认细菌，直接标本试验已经被其他免疫方法(酶联免疫和PCR-免疫层析杂交试验)取代。

三、培养基

病原微生物实验室培养是诊断由细菌引起的感染病的核心。路易·巴斯德于1860年第一次用培养基在实验室培养细菌。巴斯德的第一个培养基由糖、铵盐和酵母浸膏组成。它满足了许多细菌的基本生长需求，例如，糖形式的碳源可提供生长和代谢的能量；细菌利用氮源来合成蛋白质和核酸；从酵母浸膏中获得生长因子，包括维生素和矿物质。

其他培养基由罗伯特·科赫及其同事开发，他们使用动物和植物的组织作为营养素支持细菌生长。其中科赫实验室中一个工作人员的妻子范妮黑塞(Fanny Hesse)有一重要发现，使用琼脂固化培养基可让微生物在其上增长。使用固体培养基让细菌分离纯培养。植物和动物组织的提取物

制备成肉汤或加上琼脂，形成多种混合固体培养基。几乎任何植物、动物或动物器官都可用来制备培养基，如心脑浸液是由牛心、小牛脑和牛肝制备。从最早开发培养基开始，就存在哪些培养基能支持哪些特定病原体生长的科学设计和偶然发现之间的平衡。20世纪初，很多培养基都可对诊断提供帮助。经典的成分，如脑心浸液琼脂，是许多培养基的基础成分，至今仍广泛用于临床微生物实验室。

每种培养基都有特定的用途。有关用于检测新出现的抗菌药物耐药性病原体的培养基见表20-2。在选择特定培养基各有利弊，必须考虑每个培养基的优缺点和限制性，对其在临床实验中获得的结果进行评估。对培养基的比对结果见参考文献[17～20]。

表 20-2 用于新出现的抗生素耐药性病原体的培养基

目标病原菌	培养基	应用
产 ESBL 肠杆菌科细菌	Brilliance ESBL 琼脂	用于直接从临床标本中假设性鉴定产 ESBL 大肠埃希菌和克雷伯菌属、肠杆菌属、沙雷菌属、枸橼酸杆菌属(KESC)组
	CHROMagar CTX	用于超广谱 β 内酰胺酶(ESBL)CTX-M 型耐药菌的鉴定
	CHROMagarESBL（RambaCHROM ESBL）	用于产 ESBLs 的革兰阴性菌的检测
	chromID ESBL	用于产 ESBL 肠杆菌的筛选
	HardyCHROM ESBL 琼脂	用于产 ESBL 肠杆菌的分离和鉴别
	VACC 琼脂培养基（Remel VACC 琼脂培养基）	用于产 ESBL 肠杆菌的初步分离、选择和鉴别
碳青霉烯类耐药的肠杆菌科细菌	Brilliance CRE 琼脂	用于鉴定直接来自临床标本的耐碳青霉烯类大肠埃希菌、KESC 组
	CHROMagarKPC（RambaCHROM KPC）	用于检测由于肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶而对大多数碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的革兰阴性菌
	chromID CARBA 琼脂	用于筛选碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌
	HardyCHROM CRE 琼脂	用于选择和鉴别碳青霉烯类耐药的革兰阴性菌
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	Brilliance MRSA 琼脂	用于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的筛选
	CHROMagarMRSA（RambaCHROM MRSA）	用于定性和直接检测鼻腔定植的 MRSA
	chromID MRSA	用于 MRSA 的直接分离和鉴定
	含甲氧西林 HiCrome MeReSa 琼脂	用于 MRSA 的分离和培养
	含甲氧西林 HiCrome MeReSa 琼脂基础	用于 MRSA 的分离和培养
	MRSA 选择培养基	用于直接从鼻和伤口标本检测 MRSA
耐万古霉素肠球菌	Brilliance VRE 琼脂	用于假设性鉴定直接来自于临床标本中的屎肠球菌和粪肠球菌
	CHROMagarVRE（RambaCHROM VRE）	用于鉴别和假设性鉴定万古霉素耐药肠球菌(粪肠球菌和屎肠球菌)
	chromID VRE	用于万古霉素耐药的屎肠球菌和粪肠球菌的快速、可靠的定性检测
	含万古霉素肠球菌琼脂	用于 VRE 的检测
	VRE 琼脂	用于 VRE 的分离
	VRE 选择培养基	用于肛拭子和粪便标本筛查 VRE
产青霉素酶淋病奈瑟菌	PPNG 选择培养基	用于鉴别和假设性鉴定产青霉素酶的淋病奈瑟菌菌株

这几部著作已详细地描述了用于细菌培养的培养基的配方[17,21-28]。此外，微生物培养基主要的产生商在网站提供了有关培养基的具体组成成份，也提供了培养基的制备和特殊培养基的使用方法，如 Becton-Dickinson 公司（http://www.bd.com/）、Gibco Invitrogen Cell Culture Products（https://www.thermofisher.com/us/en/home/refcrences/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-products.html）、Hardy Diagnostics（http://www.hardydiagnostics.com/?gclid=CMifuc62tJsCFR7yDAodZlWRQg）、HiMedia（http://www.himedialabs.com/）和 Oxoid Ltd.（http://www.oxoid.com/uk/blue/index.asp）。商业培养基中提供的数据也包含了正确使用的关键信息。

(一)培养基的组成成分

琼脂是微生物培养基中最常用的固化剂[29]。琼脂是一种多糖海洋藻类提取物，熔点为 84℃，凝固点为 38℃。较高浓度琼脂(15 g/L)通常用于制备固体培养基。较低浓度琼脂(7.5～10.0 g/L)用于生产软琼脂或半固体培养基。

许多培养基含有蛋白胨作为氮源。通过酶或酸性消化水解蛋白胨提供蛋白质。酪蛋白是最常用作形成蛋白胨的蛋白质底物，其他物质如大豆粉也被普遍采用。

肉类和植物浸液通常是用作微生物营养素的水提物。这种浸液含有氨基酸和低分子量的肽、碳水化合物、维生素、矿物质和微量金属元素。动物组织的提取物含有相对高浓度的水溶性蛋白质成分和糖原。植物组织的提取物含有相对高浓度的碳水化合物。

pH 通常精确到小数点后 1 位。因此，缓冲液是很多培养基的一个关键组成部分。一些厌氧菌的培养基包含巯基等要素以减少对分子氧的利用，从而使得厌氧菌可以进行培养。使用专门的培养基培养厌氧菌对临床微生物学很重要[30]。

很多微生物需要培养基有特异性生长因子，必须用含有这些因子的培养基才能成功培养。在培养基中加入关键生长因子始于 20 世纪 30 年代。新的培养基配方逐渐被开发，包括加入维生素、氨基酸、脂肪酸、微量金属元素和血液成分，以满足特殊病原体对生长因子的要求。多数情况下，微生物培养基中含有多种生长因子的混合物。酪蛋白酸水解物通常用作氨基酸的来源。酵母细胞的提取物也被用作微生物的氨基酸和维生素来源。许多在临床实验室中使用的培养基包含血液或血液成分作为必需营养素以培养苛养菌。

许多培养基含有抑制剂，目的是选择性抑制非目标细菌的生长。选择性培养基对从混合菌种中分离特定病原体非常有用。选择性抑制物还经常用于选择特定的细菌菌种。例如，从粪便样本中分离病原体，因为粪便中含有大量非致病的正常菌群，就需要应用选择性培养基。通常情况下，抗菌药物或其他抑制物加入培养基中来抑制背景中的微生物群，同时让培养的目标微生物生长。胆汁盐、亚硒酸钠、连四硫酸盐、亚碲酸盐、叠氮化物、苯乙醇、十二烷基硫酸钠、高浓度氯化钠和各种染料如曙红、结晶紫和亚甲蓝等被用作选择性抑制剂。使用抗菌药物，包括氨苄西林、氯霉素、黏菌素、放线菌酮、庆大霉素、卡那霉素、萘啶酸、磺胺嘧啶和万古霉素等来抑制特定类型的微生物。各种抗菌药物的组合可有效地抑制各类微生物，如肠道细菌。

一些培养基包含关键代谢反应底物以鉴别特定的病原体。包括从各种碳水化合物产生的酸和其他碳源或氨基酸脱羧产生的氨基酸。一些含指示剂的培养基可观察代谢反应中 pH 的变化。一些培养基还包括显色剂染料，以观察特定酶反应时的颜色变化。显色培养基来源见表 20-3。

表 20-3 商业化细菌显色培养基

细菌	培养基	生产商
鲍曼不动杆菌	CHROMagar 不动杆菌琼脂	CHROMagar
艰难拟梭菌	chrom ID 艰难拟梭菌培养基	bioMérieux
大肠埃希菌	CHROMagar 大肠埃希菌琼脂	CHROMagar
	CHROMagar ECC 琼脂	CHROMagar

（续 表）

细菌	培养基	生产商
	BBL 大肠埃希菌 CHROMagar 琼脂	BD[a]
	大肠菌群加强选择性培养基	Merck
	Brilliance UTI 琼脂	Oxoid
	Brilliance UTI 透明琼脂	Oxoid
	CHROMagar STEC 琼脂	CHROMagar
	ChromID CPS 琼脂	bioMérieux
	HiCrome UTI 琼脂	Sigma-Aldrich
	HardyCHROM BluEcoli 琼脂	Hardy Diagnostics
大肠埃希菌 O157:H7	O157 琼脂	CHROMagar
	BBLO157 CHROMagar 琼脂	BD
	O157 Rainbow Agar	Biolog[b]
	chromID O157:H7 ID 琼脂	bioMérieux
李斯特菌	CHROMagar 李斯特菌琼脂	CHROMagar
	BBL 李斯特菌 CHROMagar 琼脂	BD
	产单核细胞李斯特菌显色培养基	Biosynth International
	HiCrome 改良李斯特菌琼脂	Sigma-Aldrich
耐甲氧西林金黄色葡萄球菌	CHROMagar MRSA 琼脂	CHROMagar
	BBL CHROMagar MRSA 琼脂	BD
	BBL 金黄色葡萄球菌 CHROMagar 琼脂	BD
	Brilliance MRSA 琼脂	Oxoid
	chromID MRSA 显琼脂	bioMérieux
	含甲氧西林 HiCrome MeReSa 琼脂	Sigma-Aldrich
	HardyCHROM MRSA 琼脂	Hardy Diagnostics
肠球菌	CHROMagar Orientation 琼脂	CHROMagar
	BBL 肠球菌 CHROMagar 琼脂	BD
	Brilliance UTI 琼脂	Oxoid
	Brilliance UTI 透明琼脂	Oxoid
	chromIDCPS 琼脂	bioMérieux
铜绿假单胞菌	CHROMagar 假单胞菌琼脂	CHROMagar
	chromID 铜绿假单胞菌显色琼脂	bioMérieux
沙门菌	CHROMagar 沙门菌琼脂	CHROMagar
	BBL 沙门菌 CHROMagar 琼脂	BD
	Rainbow Agar 沙门菌琼脂	Biolog
	CHROMagar 沙门菌 plus 琼脂	CHROMagar
	Brilliance 沙门菌琼脂	Oxoid
	chromID 沙门菌琼脂	bioMérieux
	HiCrome RajHans 培养基	Sigma-Aldrich
	HiCrome 沙门菌琼脂	Sigma-Aldrich
	Hardy CHROMS 沙门菌琼脂	Hardy Diagnostics
金黄色葡萄球菌	CHROMagar 金黄色葡萄球菌琼脂	CHROMagar
	chromID 金黄色葡萄球菌琼脂	bioMérieux
	Brilliance 葡萄球菌 24h 琼脂	Oxoid

（续　表）

细菌	培养基	生产商
	chromID 金黄色葡萄球菌培养基	bioMérieux
	HiCrome 金黄色葡萄球菌琼脂	Sigma-Aldrich
	SaSelect 培养基	Bio-Rad
	HardyCHROM 金黄色葡萄球菌琼脂	Hardy Diagnostics
B 群链球菌	CHROMagar B 群链球菌琼脂	CHROMagar
	chromID B 群链球菌琼脂	bioMérieux
弧菌	CHROMagar 弧菌琼脂	CHROMagar
	chromID 弧菌琼脂	bioMérieux
小肠结肠炎耶尔森菌	CHROMagar 小肠结肠炎耶尔森菌琼脂	CHROMagar
耐万古霉素肠球菌	CHROMagar VRE 琼脂	CHROMagar
	Brilliance VRE 琼脂	Oxoid
	chromIDVRE 琼脂	bioMérieux
	VRESelect 培养基	Bio-Rad
产 ESBL 肠杆菌科细菌	Brilliance ESBL 琼脂	Oxoid
	CHROMagar 头孢噻肟琼脂	CHROMagar
	CHROMagar ESBL 琼脂	CHROMagar
	chromID ESBL 琼脂	bioMérieux
	HardyCHROM ESBL 琼脂	Hardy Diagnostics
	ESBL Rambach 琼脂	Gibson Bioscience[c]
	VACC 琼脂	Remel
碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌	CHROMagar KPC 琼脂	CHROMagar
	chromID CARBA 琼脂	bioMérieux
	HardyCHROM CRE 琼脂	Hardy Diagnostics
	KPC Rambach 琼脂	Gibson Bioscience

注：[a] Becton Dickinson 与 CHROMagar(Parise, France)达成许可协议；[b] 与 FocusBiotech Sdn, Bhd. 达成许可协议；[c] Gibson Bioscience 和 CHROMagar(Parise, France)达成许可协议

有些培养基包含有毒或致癌性的成分。使用这些培养基时必须采用相应的安全防范措施。碱性品红和酸性品红是致癌物，处理含有这些化合物的培养基时必须谨慎，避免暴露而导致恶性肿瘤的发生。某些培养基中含有的铊盐、叠氮化钠、亚硒酸氢钠和氰化物是有毒的。对这些有毒的化合物必须采取措施以避免摄取、吸入或皮肤接触。叠氮化合物还能与许多金属反应，特别是铜，会形成具有爆炸性的金属叠氮化合物。该叠氮化合物的处置必须避免与铜接触或要有足够的稀释，以避免形成这种危险的易爆化合物。放线菌酮是有毒的，应避免皮肤接触或产生或吸入气溶胶。使用人类血液或人体血液成分的培养基必须非常谨慎，以避免暴露于被艾滋病病毒和其他病原体污染的血液。必须遵循处理和处置程序对含血液的培养基及其他被用于培养微生物的培养基进行妥善处理。

培养基的制备　遵循制造商的指示制备培养基是很重要的。通常培养基溶解后进行高压灭菌。当使用琼脂为固化剂时，必须缓慢加热培养基，一般要煮沸来溶解琼脂。在某些情况下不同成分间会相互作用，如金属会产生沉淀，所以制备培养基时各种溶液必须单独准备，分开灭菌。通常在灭菌前调整培养基的 pH，但在某些情况下，需要灭菌后用无菌的酸或碱调节 pH。很多培养基都是在高温下消毒，最常用的方法是高压灭菌。当培养基配方中有不耐热化合物时，可采用不同的灭菌程序。

高压灭菌器利用高压蒸汽杀灭微生物。最常用的方法是以 15 lb/in^2 121℃蒸汽下 15 min。该

方法可杀细菌繁殖体和芽胞。然而，一些物质不能用高温、高压灭菌，需采用较低的温度和不同的时间，含碳水化合物培养基常在116～118℃蒸汽进行灭菌，以防止分解碳水化合物而形成有毒化合物，从而抑制微生物的生长。

正确制备培养基非常关键，加上人员的成本因素，因此许多临床实验室购买商业成品培养基。不管培养基在实验室制备的还是购买的，质量控制都是必不可少的[31-32]。质量控制是利用培养物定期检查培养基的质量。所有测试菌株在通用培养基上均应生长充分、菌落形态典型。选择性培养基应抑制特定微生物的生长，而目标微生物必须能够充分生长。鉴别培养基必须显示细菌菌落的特征如菌落的颜色和溶血反应。培养基必须在失效期前使用。美国临床实验室标准化研究所(CLSI)发布商业化微生物培养基的质量保证标准[32]。

(二)细菌培养基

下面介绍临床微生物实验室使用的具代表性的培养基。

1. A7琼脂(Shepard鉴别琼脂) A7琼脂用于尿中解脲脲原体的培养及鉴别解脲脲原体分解尿素产生氨的能力。培养基中含有消化酪蛋白和大豆生长因子，包括半胱氨酸、NAD、辅羧酶、维生素、酵母提取物和具有选择作用的青霉素。硫化锰作为营养因子。尿素是一个关键成分，可以检测出水解尿素产生氨的解脲脲原体，此时菌落显示为金色至暗棕色。

2. A8琼脂 A8琼脂用于尿中解脲脲原体的培养及基于其分解尿素产生氨的能力来鉴别解脲脲原体。该培养基还支持人型支原体的生长。培养基中含有的酪蛋白和大豆生长因子，包括半胱氨酸、NAD、辅羧酶、维生素、酵母提取物和具有选择作用的青霉素。硫化锰、氯化钙和腐胺二盐酸盐作为营养成分。两性霉素B和青霉素G添加作为选择性成分。尿素是检测解脲脲原体的关键成分。解脲脲原体培养基中含有的硫酸锰与脲酶结合形成金棕色，用来与其他生殖道支原体相鉴别。

3. 乙酰胺琼脂 乙酰胺琼脂用于区分非发酵革兰阴性细菌，尤其是铜绿假单胞菌[33-34]。乙酰胺是生长和鉴别的关键基础成分。大多数细菌不能以乙酰胺为唯一的碳源和氮源。如果以溴百里酚蓝作为指示剂，细菌使乙酰胺脱氨后培养基转为蓝色，如果含有酚红则转为红色。颜色变化是由于利用乙酰胺后释放氨。

4. 醋酸鉴别琼脂(改良西蒙斯柠檬酸琼脂) 该琼脂用于志贺菌与大肠埃希菌鉴别，也用于非发酵的革兰阴性细菌的鉴别[35]。培养基含有醋酸盐作为唯一的碳源。细菌利用醋酸盐为唯一碳源使培养基改变pH而变成蓝色。

5. 碱性蛋白胨盐肉汤 肉汤用于粪便标本中霍乱弧菌和其他弧菌的培养，蛋白胨是生长底物，3%的盐用于选择弧菌属。

6. 碱性蛋白胨水 该培养基用于培养和运输霍乱弧菌和嗜水气单胞菌。蛋白胨是生长底物，盐浓度为1%。

7. 美国特鲁多协会(ATS)培养基 ATS培养基用于分离和培养除麻风分枝杆菌以外的分枝杆菌属的细菌，特别用于从临床标本中检测结核分枝杆菌，如脑脊液、胸膜积液和组织标本。培养基中含有鸡蛋，提供了分枝杆菌生长需要的脂肪酸，土豆作为碳源，孔雀石绿是选择性成分。

8. 含活性炭Amies转运培养基 该培养基用于转运拭子标本以延长标本中的微生物从采集到培养的生存时间。磷酸盐缓冲液、钙离子和镁离子帮助保护细胞免受裂解。活性炭能中和可能对淋病奈瑟菌有毒的代谢产物。

9. 不含活性炭Amies转运培养基 该培养基用于转运拭子以延长微生物的生存时间。磷酸盐缓冲液，钙和镁离子保护细胞免受裂解。

10. 厌氧黏菌素-萘啶酸(CNA)琼脂 该琼脂用于选择性分离厌氧链球菌。消化酪蛋白、动物组织、酵母提取物、牛肉提取物和葡萄糖提供成长需要的碳和氮。二硫苏糖醇和半胱氨酸有助于创造厌氧条件。培养基含有黏菌素和萘啶酸作为选择性成分。加入血用于苛养菌株的生长，亦可根据溶血反应鉴别细菌。

11. Ashdown培养基 Ashdown培养基用于从痰等临床样本中选择性分离类鼻疽伯克霍尔德菌。培养基中含有结晶紫和庆大霉素作为抑制剂，富含甘油和中性红。在该培养基上类鼻疽伯克霍尔德菌为扁平的、有褶皱的紫色菌落。Ashdown琼脂和Ashdown肉汤可以通过加入抗菌药物改良为类鼻疽伯克霍尔德菌的选择性培养

基，改良的 Ashdown 肉汤仍然是来自类鼻疽疑似患者的咽拭子分离的类鼻疽伯克霍尔德菌的标准培养基[36]。

12. 蜡样芽胞杆菌培养基 该培养基用于蜡样芽胞杆菌的培养。培养基含有甘露醇、鸡蛋和酵母提取物。溴甲酚紫有助于鉴别蜡样芽胞杆菌。

13. 蜡样芽胞杆菌选择性基础琼脂 该培养基用于选择性分离培养、计数和假设性鉴定蜡样芽胞杆菌。该培养基含有甘露醇、鸡蛋和酵母提取物。多黏菌素 B 作为选择性成分。溴百里酚蓝有助于鉴别。蜡样芽胞杆菌菌落为中等大小(直径 5 mm)、圆形、锯齿状的青绿色菌落，菌落周围环绕着青绿色的蛋黄沉淀。

14. 拟杆菌胆汁七叶苷琼脂 该琼脂用于选择培养和假设性鉴定脆弱拟杆菌群，并可基于七叶苷的水解和触酶的存在鉴定拟杆菌属[4]。培养基含有消化酪蛋白和大豆。血红素、维生素 K_1、牛胆汁和庆大霉素是培养基的选择性成分。七叶苷是鉴定拟杆菌属关键的成分。拟杆菌在该培养基上生长为灰色、圆形、凸起的菌落，直径大于 1.0 mm。七叶苷水解试验阳性是指菌落周围出现黑色区域。

15. Baird-Parker 培养基 该培养基用于选择性分离和计数凝固酶阳性葡萄球菌。该培养基含有甘氨酸、丙酮酸、消化酪蛋白、牛肉膏、氯化锂、酵母提取物、鸡蛋和亚碲酸盐。

16. Barbour-Stoenner-Kelly 培养基 该培养基用于在明确化合物的培养基上培养各种微生物，包括疏螺旋体属和螺旋体属。这是一个含有大量维生素和生长因子的复合培养基。含有明胶、葡萄糖、丙酮酸、蛋白胨、白蛋白和血清。

17. BCM O157：H7(＋)平板培养基 这种 Biosynth International 公司(Itasca IL)的专有培养基，用于检测高致病性的肠出血性大肠埃希菌血清型 BCM O157：H7(＋)。

18. BCPD 琼脂(溴甲酚紫脱氧胆酸琼脂) 该培养基用于从临床标本中，特别是从粪便标本，分离和鉴别革兰阴性肠道杆菌。培养基含有乳糖、蔗糖和脱氧胆酸钠，形成鉴别细菌的基础。培养基还含有蛋白胨、酵母提取物和柠檬酸盐。细菌不发酵乳糖和蔗糖，显示为无色或蓝色菌落；发酵乳糖和蔗糖，如大肠菌群，显示为黄色不透明的白色菌落，周围有脱氧胆酸钠沉淀晕。

19. 胆汁七叶苷琼脂 该培养基用于鉴别 D 群链球菌和非 D 群链球菌；亦可用于鉴别肠杆菌，特别用于克雷伯菌属、肠杆菌属和沙雷菌属与其他肠杆菌及产单核细胞李斯特菌的鉴别。胆汁耐受和七叶苷水解(深褐色至黑色的复合物)用于肠球菌(D 群链球菌)的假设性鉴定。可添加万古霉素来鉴别万古霉素耐药肠球菌(VRE)。

20. 含卡那霉素的胆汁七叶苷琼脂 该培养基从混合生物标本中选择性分离和(或)初步鉴定脆弱拟杆菌群。该培养基含有牛肉膏和七叶苷，还含有血红素和维生素 K_1 作为生长因子。当用长波长紫外光检查拟杆菌的菌落时显示红橙色荧光。牛胆汁和卡那霉素是培养基的选择性成分。培养基变黑初步鉴别为脆弱拟杆菌群。

21. 胆汁七叶苷叠氮代物琼脂 该培养基用于分离和假设性鉴别 D 群链球菌。培养基含有消化酪蛋白、蛋白胨、铁、七叶苷及酵母提取物。牛胆汁(胆汁)和叠氮钠是选择性成分。七叶苷在含有柠檬酸铁的培养基中水解，形成棕黑色。牛链球菌及粪肠球菌菌落周围形成黑色区域作为该反应的结果。

22. 亚硫酸铋盐琼脂 此培养基用于选择性分离和鉴定伤寒沙门菌和其他肠道杆菌，含有消化酪蛋白和动物组织，葡萄糖、牛肉提取物和硫酸亚铁。亚硫酸铋盐是选择性成分。如果生产硫化氢，与铁反应产生黑色的沉淀物。伤寒沙门菌产生扁平、“兔眼”包围的带金属光泽的黑色菌落。

23. 血琼脂 该培养基用于分离和检测链球菌等苛养菌的溶血活性。基础培养基含有牛肉提取物和蛋白胨。尽管为观察如嗜血杆菌属的溶血特征可用兔血和马血替代绵羊血，但血琼脂常添加绵羊血。

24. 无血弯曲杆菌选择性琼脂 该培养基用于选择性分离弯曲菌属，尤其是从人类粪便分离空肠弯曲菌。该培养基包含消化酪蛋白、动物组织、丙酮酸和硫酸亚铁。培养基中含炭以去除有毒的代谢产物。脱氧胆酸钠和头孢唑啉是抑制剂。

25. 百日咳鲍特菌选择培养基 该培养基用于选择性分离和假设性鉴定百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌。该培养基含有 Bordet-Gengou 琼脂基础，含有消化酪蛋白和动物组织，还含有

血液、头孢氨苄。百日咳鲍特菌菌落较小，几乎是透明的、“双球珍珠样的(bisected pearl-like)”菌落。

26. 木炭琼脂基础的百日咳菌基础选择性培养基 该培养基用于选择性分离和假设性鉴定百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌。该培养基含有炭琼脂基质，含有消化酪蛋白和动物组织、牛肉浸膏、烟酸、淀粉和炭。它还含有血液和头孢氨苄。百日咳鲍特菌菌落较小，苍白，有光泽。

27. 博-让(Bordet-Gengou)琼脂 该培养基用于临床标本中检测和分离百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌。将甲氧西林加入培养基作为抑制剂。培养基中含有消化酪蛋白、动物组织、甘油、土豆浸液和兔血。百日咳鲍特菌菌落较小(<1 mm)，光滑，珍珠样，有狭窄的溶血。副百日咳鲍特菌在该培养基中为棕色、无光泽的菌落，菌落背面为黑绿色。支气管败血鲍特菌(*Bordetella bronchiseptica*)为棕色、无光泽、中等大小、表面粗糙的菌落。

28. 牛血清白蛋白吐温-80 培养基、改良 Ellinghausen 和 McCullough 培养基(白蛋白脂肪酸肉汤，钩端螺旋体培养基) 该培养基用于钩端螺旋体的培养。该培养基含有甘油、丙酮酸、硫胺素和白蛋白脂肪酸补充剂。

29. 脑心浸出液 该培养基用于各种临床标本培养苛养的和非苛养微生物，包括需氧和厌氧细菌。该培养基含有消化的明胶、动物组织、葡萄糖和脑心浸出液。该培养基特别用于培养链球菌、肺炎链球菌和脑膜炎奈瑟菌。添加万古霉素可用于检测 VRE。本培养基和麦康凯培养基、HardyCHROM ECC 琼脂联合使用，可检测直肠拭子中耐氟喹诺酮的细菌，其检测效果优于直肠活检[37]。

30. 0.7%脑心浸出液琼脂 该培养基用于检测葡萄球菌的肠毒素。培养基中含有蛋白胨、葡萄糖和牛的脑心浸出液。

31. Brilliance CRE 琼脂 该培养基用于假设性鉴定直接来自培养 18 h 内临床标本中耐碳青霉烯类抗菌药物的大肠埃希菌和克雷伯菌属、肠杆菌属、沙雷菌属、枸橼酸杆菌属(KESC)组。该培养基含有抗菌药物，抑制对碳青霉烯类抗菌药物敏感的细菌，使目标菌产色以快速鉴别。

32. Brilliance ESBL 琼脂 该琼脂用于检测培养 24 h 的直接来自临床标本中产超广谱β-内酰胺酶(ESBL)细菌，也用于初步鉴定产 ESBL 大肠埃希菌和 KESC 组。产 ESBL 大肠埃希菌是蓝色或粉红色菌落，产 ESBL 的 KESC 组细菌是绿色菌落；变形杆菌、摩根菌和普鲁威登菌不利用任何色原，但能够使色氨酸脱氨，其菌落为带有棕色晕的黄褐色菌落。抗菌药物混合物抑制β-内酰胺抗菌药物敏感的细菌生长。

33. Brilliance MRSA 琼脂 该培养基用于耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的筛选。Brilliance MRSA 琼脂采用新的发色技术，能够以产生蓝色作为磷酸酶活性的结果，检测许多葡萄球菌，包括金黄色葡萄球菌。为了让培养基准确区分 MRSA，培养基中添加了一个抗菌药物组合以抑制其他非目标菌生长。亦有化合物抑制其他葡萄球菌磷酸酶的活性表达，从而保证高敏感性和特异性。

34. Brilliance 沙门菌琼脂 该培养基用于从临床标本假设性检测和鉴别沙门菌。所含的抑制剂专门针对大肠埃希菌，特别适合用于测试粪便标本。另外加入化合物以抑制其他生物群的竞争生长。从 Brilliance 沙门菌琼脂鉴别沙门菌生长是通过针对特定酶的两个发色团取得：辛酸酯酶和β-葡糖苷酶。色原与酶的作用产生堆积在菌落之内的颜色。产生的颜色取决于生物拥有的酶。辛酸酯酶存在于所有的沙门菌，结果生成紫色菌落。一些肠杆菌科细菌也会产生辛酸酯酶，但可通过β-葡糖苷底物与沙门菌鉴别。存在β-葡萄苷酶的肠杆菌科细菌形成蓝色菌落，很容易就可以与紫色沙门菌区分。

35. Brilliance 葡萄球菌 24 琼脂 该培养基用于 24 h 内食物中培养、分离和计数凝固酶阳性葡萄球菌。凝固酶阳性葡萄球菌在一个清晰的背景中显为深蓝色菌落。

36. Brilliance 尿路感染细菌培养琼脂 该培养基用于假设性鉴定和鉴别所有导致尿路感染(UTI)的主要微生物。Brilliance UTI 琼脂含有两个特定的显色底物，被由肠球菌属、大肠埃希菌和大肠菌群产生的酶裂解。此外，它含有苯丙氨酸和色氨酸以供色氨酸脱氨酶的检测，提示变形杆菌、摩根菌和普鲁维登菌属的存在。

37. Brilliance 尿路感染细菌培养透明琼脂 该培养基用于检测和鉴别大肠菌群及假设性鉴定导致尿路感染的主要致病菌。Brilliance 尿路感染

细菌培养透明琼脂包含两个产色底物，可被大肠埃希菌、肠球菌属和大肠菌群产生的酶裂解。培养基中的2个色原，一个是由大肠埃希菌产生的β-半乳糖苷酶代谢，生长成粉红色菌落；另一个用具有活性的β-葡糖苷酶裂解，特异性地检测肠球菌，形成蓝色或蓝绿色菌落。同时裂解两种色原形成深蓝色或紫色的菌落，提示为大肠菌群。培养基中的色氨酸是一个色氨酸脱氨酶活性的指示剂，导致变形杆菌、摩根菌和普鲁威登属菌落形成褐色晕。

38. Brilliance耐万古霉素肠球菌琼脂　该显色琼脂用于发现VRE和假设性鉴定直接来自培养24 h内的临床标本中屎肠球菌和粪肠球菌。VRE是淡蓝色菌落（粪肠球菌）或靛蓝紫色菌落（屎肠球菌），这两者在新的、半透明的背景下都能非常清晰地显示出来。

39. 亮绿琼脂　该培养基用于从粪便和其他临床标本中选择性分离除伤寒沙门菌的沙门菌属的细菌。该培养基含有乳糖、蔗糖、消化酪蛋白和动物组织，再加上酚红和亮绿。非伤寒沙门菌的沙门菌属细菌在琼脂上出现红色、粉红色或白色菌落，而且有红晕，表明不发酵乳糖和蔗糖。变形杆菌或假单胞菌属可能显示为小红色菌落。乳糖或蔗糖发酵菌在琼脂上出现黄绿色菌落，而且有黄绿晕。

40. 亮绿酚红琼脂　该培养基用于从粪便中分离培养除伤寒沙门菌外的沙门菌属。该琼脂中含有乳糖和蛋白胨，再加上亮绿和酚红作为鉴别指示剂。沙门菌属产生略带粉红色的白色菌落。

41. 布鲁菌琼脂　该培养基用于从各种临床标本中培养布鲁杆菌和分离苛养菌及非苛养菌。该培养基含有消化酪蛋白、动物组织、亚硫酸钠、酵母提取物、葡萄糖和血。该培养基可补充添加血红素和维生素K_1改善细菌生长，也可添加血用于检测链球菌属和嗜血杆菌属的溶血反应。

42. 布鲁菌琼脂基础的弯曲菌属培养基　该培养基用于从粪便标本或直肠拭子中选择性分离和培养空肠弯曲菌。该培养基含有消化酪蛋白、动物组织、酵母提取物、葡萄糖、丙酮酸盐、亚硫酸钠和硫酸亚铁。它还包含放线菌酮、头孢唑啉钠、新生霉素、杆菌肽和多黏菌素硫酸盐作为抑制剂。

43. 含血液和选择性添加剂的布鲁菌琼脂　该培养基用于布鲁菌的培养和保存，以及用于从各种临床标本分离和培养苛养菌及非苛养菌。该培养基含有水解酪蛋白、蛋白胨、酵母提取物、葡萄糖、亚硫酸钠和血。放线菌酮、萘啶酸、万古霉素、杆菌肽和多黏菌素B用作选择性补充剂。

44. 布鲁菌血培养肉汤　该培养基用于从血液中分离和培养微生物。该培养基特别有助于厌氧菌的培养。它包含消化酪蛋白和动物组织，添加亚硫酸钠、酵母提取物、蔗糖、葡萄糖、氯化血红素、维生素K_1和血，也可添加血红素为补充剂。

45. 布鲁菌肉汤（布鲁菌Albimi肉汤）　该培养基用于培养和保存结肠弯曲菌、粪弯曲菌和布鲁菌。也可用于分离各种苛养菌或非苛养菌。培养基含有消化酪蛋白和动物组织、酵母提取物、葡萄糖、亚硫酸钠和血。

46. 含卡那霉素和万古霉素的布鲁菌溶解绵羊血琼脂　该培养基用于同一标本中分离苛养菌和生长缓慢的专性厌氧菌。培养基中含有蛋白胨、葡萄糖、酵母提取物、羊血、血红素和维生素K_1。卡那霉素和万古霉素作为抑制剂。溶血可提高产黑素普雷沃菌和不解糖卟啉单胞菌的色素沉着。

47. 含半胱氨酸的活性炭酵母提取物缓冲液琼脂（α-BCYE基础）　该培养基用于临床标本中嗜肺军团菌和其他军团菌的分离。该培养基含有半胱氨酸、α-酮戊二酸、铁、酵母提取物、*N*-(2-乙酰氨基)-2-氨基乙磺酸（ACES）缓冲液和活性炭。铁和半胱氨酸是军团菌生长所需的特殊生长因子。炭能去除有毒代谢产物。抗菌药物如多黏菌素B、茴香霉素和万古霉素或头孢孟多通常作为抑制剂。嗜肺军团菌在这种培养基上产生浅绿色痕迹的淡蓝色菌落。

48. 活性炭酵母浸出物（提取物）缓冲液鉴别琼脂　该培养基用于从临床标本中分离、培养和保存嗜肺军团菌和其他军团菌。培养基含有炭，以减少代谢产物的毒性。还包括半胱氨酸和铁，这是军团菌必需的生长因子；万古霉素和多黏菌素B作为抑制剂。

49. 洋葱伯克霍尔德菌琼脂　该培养基用于从囊性纤维化患者的呼吸道分泌物中选择性分离洋葱伯克霍尔德菌。缓慢生长的洋葱伯克霍尔德菌在血琼脂或麦康凯琼脂等常规培养基上容易被忽视，这是由于囊性纤维化患者呼吸道中的其他微生物生长较快，甚至过度生长，如黏液型克雷伯

菌、铜绿假单胞菌和葡萄球菌属等。可能导致感染被漏诊或误诊。培养基中含有胆盐、庆大霉素、替卡西林和多黏菌素B等抑制剂。它还包含丙酮酸盐、蛋白胨和酵母提取物。

50. 洋葱伯克霍尔德菌选择性琼脂 该培养基用于洋葱伯克霍尔德菌的选择性分离。它包含消化酪蛋白、酵母提取物、蔗糖和乳糖，还含有多黏菌素B、庆大霉素、万古霉素和结晶紫等作为抑制剂。

51. 类鼻疽伯克霍尔德菌选择性琼脂 该培养基用于类鼻疽伯克霍尔德菌的选择性分离。该培养基是在Ashdown选择性琼脂基础上改良的，用于非无菌部位的临床标本。培养基中含有标准琼脂、麦芽糖和中性红。

52. Blaser弯曲菌琼脂 该培养基用于从粪便标本中选择性分离空肠弯曲菌。培养基中含有头孢菌素、万古霉素、甲氧嘧啶、两性霉素B、多黏菌素B作为抑制剂。还含有蛋白胨、酵母提取物和肝消化物。

53. Skirrow弯曲菌琼脂 该培养基用于从粪便标本中选择性分离空肠弯曲菌。培养基中含有万古霉素、甲氧嘧啶和多黏菌素B作为抑制剂。也含有蛋白胨、酵母提取物和肝消化物。

54. 弯曲菌血琼脂 该培养基用于从临床标本中分离空肠弯曲菌。它含有蛋白胨、葡萄糖、酵母提取物和血液。还含有头孢菌素、万古霉素、甲氧嘧啶、两性霉素B和多黏菌素B作为抑制剂。

55. 弯曲菌属活性炭鉴别琼脂(Preston非血液培养基) 该培养基用于弯曲菌属的培养。培养基含有头孢哌酮和脱氧胆酸钠作为抑制剂，炭用来清除有毒的代谢产物，还含有蛋白胨、牛肉提取物、丙酮酸盐和硫酸亚铁。该培养基不需要血液来支持弯曲菌生长。

56. 弯曲菌选择性培养基，Blaser-Wang 该培养基用于弯曲菌的选择性分离。培养基中含有万古霉素、甲氧嘧啶和多黏菌素B作为抑制剂。还含有蛋白胨、淀粉和血。

57. 弯曲菌巯基乙酸盐(Campy-Thio)培养基 该培养基用于从临床标本的拭子中分离、保存或转运空肠弯曲菌。培养基中含有头孢菌素、万古霉素、甲氧苄啶、两性霉素B、多黏菌素B作抑制剂，以防止污染微生物不必要的生长，包含亚硫酸钠和巯基乙酸钠，以保护细胞免受损伤。

58. Cary-Blair转运培养基 该培养基作为保存或转运培养基主要用于保存临床标本，尤其是收集肠道致病菌的转运。培养基含有保护细胞的巯基乙酸钠和氯化钙。

59. 5%绵羊CDC厌氧菌血琼脂 该培养基用于从各种临床标本中分离和培养生长缓慢的苛养菌和专性厌氧菌。该培养基使用胰蛋白酶大豆琼脂，添加琼脂、酵母提取物、维生素K_1、血红素、胱氨酸和5%羊血。可改善产黑素普雷沃菌、坏死梭杆菌与溶血梭菌以及衣氏放线菌和多形拟杆菌的生长。

60. 艰难拟梭菌香蕉肉汤 Hardy Diagnostics公司的艰难拟梭菌香蕉肉汤被推荐用于培养和发现艰难拟梭菌的选择性富集。该培养基用于医院感染控制。培养基含有布鲁菌肉汤、甘露醇、碳酸氢钠、中性红、维生素K_1、血红素、巯基乙酸、L-胱氨酸、牛磺胆酸钠、脱脂、溶菌酶和琼脂。培养后培养液浊度和黄色改变均提示细菌生长、发生甘露醇发酵，表明艰难拟梭菌的存在。

61. 头孢磺啶-氯苯酚-新生霉素琼脂 该培养基用于根据甘露糖醇发酵结果选择性分离和鉴别小肠结肠炎耶尔森菌。培养基中含有氯化锶、头孢磺啶、新生霉素、结晶紫、中性红、氯苯酚、硫酸镁、甘露醇、蛋白胨、酵母提取物和丙酮酸盐。小肠结肠炎耶尔森菌菌落显示为深红色的"靶心"中心和透明的周边。

62. 纤维二糖精氨酸赖氨酸琼脂 该培养基用于从临床标本中分离和培养苛养菌，以及在低氧环境生长的苛养微生物如流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌和淋病奈瑟菌的培养。该培养基含有精氨酸、赖氨酸、纤维二糖、脱氧胆酸盐和中性红。

63. 非USP溴棕三甲铵琼脂 该培养基用于选择性分离、培养和鉴定铜绿假单胞菌等革兰阴性非发酵菌。培养基含有胰蛋白、溴棕三甲铵以及牛心浸出液。

64. USP溴棕三甲铵琼脂(Pseudosel琼脂) 该培养基用于选择性分离、培养和鉴定铜绿假单胞菌等革兰阴性非发酵菌。该培养基含有甘油、明胶、溴棕三甲铵、硫酸钾和氯化镁。

65. 巧克力琼脂 巧克力琼脂是一种营养培养基，用于对营养要求高的苛养菌培养。培养基的主要成分是蛋白胨、淀粉、消化的牛心和绵羊血。培养基中常加入抑菌剂：头孢噻吩、万古霉

素、甲氧苄啶、两性霉素B和(或)多黏菌素B。

66. 亚碲酸盐巧克力琼脂(亚碲酸盐血琼脂) 该培养基用于选择性分离棒杆菌属细菌。培养基中含有丰富的生长因子，包括氨基酸、维生素、铁、NAD和辅羧酶。还包含消化酪蛋白、玉米淀粉和亚碲酸盐。白喉棒杆菌显示为灰黑色菌落。

67. 含亚碲酸盐血琼脂基础的霍乱弧菌培养基 该培养基用于致病弧菌的分离，尤其是霍乱弧菌，从肠杆菌科细菌严重污染的样本选择性分离弧菌属。该培养基含有动物组织、牛肉提取物、蔗糖、碳酸钠、十二烷基硫酸钠、血和亚碲酸盐。

68. 霍乱培养基[硫代硫酸钠-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖(TCBS)琼脂] 该培养基用于分离致病弧菌，尤其是霍乱弧菌。该培养基适合霍乱弧菌、副溶血性弧菌和大多数其他弧菌生长。粪便中多数肠杆菌科细菌完全抑制至少24 h。变形杆菌属和粪肠球菌可能出现少量增长，但菌落容易与弧菌菌落区别。抑制非弧菌生长，能促进致病性弧菌在35℃孵育过夜后快速增长。以下细菌形成黄色菌落：霍乱弧菌埃尔托生物型、解藻酸弧菌、麦奇尼科夫弧菌、河弧菌、肠球菌属和嗜水气单胞菌的一些菌株。副溶血性弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌和假单胞菌形成蓝绿色菌落。变形杆菌形成黄绿色的菌落。类志贺邻单胞菌通常在这种培养基上生长不良。该培养基含有蔗糖、蛋白胨、硫代硫酸钠、牛胆、枸橼酸铁、溴百里酚蓝和百里酚蓝。

69. 庖肉肉汤 该培养基用于各种厌氧菌的培养。培养基中含有消化酪蛋白、酵母提取物和肉。还包含半胱氨酸以防止曝露于氧。

70. Christensen agar 琼脂 见尿素琼脂。

71. 不动杆菌显色培养基 不动杆菌属在这种培养基上均显示出红色菌落。(CHROMagar公司总部位于巴黎；其有许可协议的产品可由美国BD公司制造。)

72. COL-APSE 科玛嘉显色琼脂 该显色琼脂用于分离鉴别耐黏菌素的革兰阴性菌。

73. CHROMagarCTX 显色培养基或 RambaCH-ROM CTX 显色培养基 该显色琼脂用于检测产ESBL和碳青霉烯酶的细菌。产生ESBL的菌株，如肺炎克雷伯菌，产生金属蓝色菌落，而大肠埃希菌产生粉红色菌落，变形杆菌产生棕色被晕包围的菌落。产生碳青霉烯酶的菌株如KESC成员产生蓝绿色至蓝灰色菌落。大肠埃希菌产生粉红色至紫红色的菌落或有粉红色到紫红色中心的半透明菌落。不动杆菌属产生奶油、不透明的菌落，假单孢菌属的菌落出现半透明或具有中性色素。

74. CHROMagar ECC 显色培养基或 RambaCH-ROM ECC 显色培养基 该培养基是用于鉴别和假设性鉴定大肠埃希菌和其他大肠菌群的专用CHROMagar显色培养基，这些细菌形成红色菌落。

75. CHROMagar 大肠埃希菌显色培养基或 RambaCHROM 大肠埃希菌显色培养基 这是用于鉴别和假设性鉴定大肠埃希菌专用的CHROMagar显色培养基，大肠埃希菌形成蓝色菌落。

76. CHROMagar ESBL 显色培养基或 RambaCH-ROM ESBL 显色培养基 该培养基用于检测产ESBL革兰阴性细菌。超广谱β-内酰胺类抗菌药物耐药的大肠埃希菌形成深粉红色至红色菌落。超广谱β-内酰胺类抗菌药物耐药的克雷伯菌属、肠杆菌属、枸橼酸杆菌属形成金属蓝色菌落。超广谱β-内酰胺类抗菌药物耐药的变形杆菌菌落有一个棕色的晕。

77. CHROMagar KPC 显色培养基或 RambaCH-ROM KPC 显色培养基 碳青霉烯类耐药的大肠埃希菌菌株在该琼脂上形成深粉至红色菌落，用于检测对大多数碳青霉烯类抗菌药物敏感性降低的革兰阴性菌。碳青霉烯类耐药的克雷伯菌属、肠杆菌属、枸橼酸杆菌属形成蓝色菌落。碳青霉烯类耐药假单胞菌株形成半透明的奶油菌落。

78. CHROMagar 李斯特菌显色培养基或 Ramba-CHROM 李斯特菌显色培养基 这是用于鉴别和假设性鉴定产单核细胞李斯特菌的专用CHROMagar培养基，形成周围白色光晕的蓝色菌落。

79. CHROMagar MRSA 显色培养基或 RambaCHROM MRSA 显色培养基 这是用于定性和直接检测鼻腔定植的MRSA的专用CHROMagar显色培养基，用于预防和控制被MRSA感染的医疗环境。

80. CHROMagar O157 显色培养基或 RambaCHROM O157 显色培养基

这是用于鉴别和假设性鉴定大肠埃希菌

O157 的专用 CHROMagar 显色培养基。

81. CHROMagar 定位显色培养基或 RambaCHROM 定位显色培养基 这是用于鉴别和假设性鉴定革兰阴性菌和肠球菌的专用 CHROMagar 显色培养基，特别用于识别尿中病原体。菌落产生具有诊断特征的颜色，例如，大肠埃希菌产生斑红色菌落。

82. CHROMagar 假单胞菌显色培养基或 RambaCHROM 假单胞菌显色培养基 这是用于同时检测和计数铜绿假单胞菌（蓝色菌落）的专用 CHROMagar 显色培养基，铜绿假单胞菌菌落与其他微生物，如腐生葡萄球菌、大肠埃希菌和奇异变形杆菌有显著不同，这些菌被抑制或形成无色菌落。

83. CHROMagar 沙门菌显色培养基或 RambaCHROM 沙门菌显色培养基 这是用于鉴别和假设性鉴定沙门菌的专用 CHROMagar 显色培养基。

84. CHROMagar 沙门菌附加显色培养基或 RambaCHROM 沙门菌附加显色培养基 这是可直接根据菌落颜色检测沙门菌的专用 CHROMagar 显色培养基。包括伤寒沙门菌、甲型副伤寒沙门菌、乳糖阳性沙门菌，菌落颜色按照 ISO 6579：2003 标准判读。

85. CHROMagar 金黄色葡萄球菌显色培养基或 RambaCHROM 金黄色葡萄球菌显色培养基 这是用于鉴别和假设性鉴定金黄色葡萄球菌的专用 CHROMagar 显色培养基。

86. CHROMagar STEC 显色培养基或 RambaC-HROM STEC 显色培养基 该琼脂用于食品、环境样品和粪便标本中产志贺毒素大肠埃希菌（STEC）的检测。最常见 STEC 的血清型形成紫红色菌落。其他肠杆菌形成无色或蓝色菌落。

87. CHROMagar B 群链球菌显色培养基或 Ramba-CHROM B 群链球菌显色培养基 这是用于鉴别和假设性鉴定 B 群链球菌（无乳链球菌）的专用 CHROMagar 显色培养基。B 群链球菌形成淡紫色到粉红色的菌落。

88. CHROMagar 弧菌显色培养基或 RambaCHROM 弧菌显色培养基 这是用于鉴别和假设性鉴定弧菌的专用 CHROMagar 显色培养基。副溶血性弧菌形成淡紫色的菌落；霍乱弧菌形成天蓝色菌落；解藻酸弧菌形成无色菌落。

89. CHROMagar VRE 显色培养基或 RambaCH-ROM VRE 显色培养基 这是用于鉴别和假设性鉴定万古霉素耐药肠球菌（粪肠球菌和屎肠球菌）的专用 CHROMagar 显色培养基。万古霉素耐药肠球菌形成玫瑰红色到淡紫色的菌落。

90. CHROMagar 小肠结肠炎耶尔森菌显色培养基或 RambaCHROM 小肠结肠类耶尔森菌显色培养基 这是用于检测和直接鉴别致病性的小肠结肠炎耶尔森菌的培养基。致病性小肠结肠炎耶尔森菌产生淡紫色菌落，非致病性小肠结肠炎耶尔森菌和其他细菌（枸橼酸杆菌属、肠杆菌属、气单胞菌属等）产生金属蓝色菌落。

91. chromID CARBA 产色鉴定培养基 该培养基用于筛选产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌。该培养基含有多种蛋白胨、能使耐碳青霉烯肠杆菌科细菌（CRE）选择性生长的多种抗生素混合物，以及可鉴定出最常分离到的产碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌的三种显色成分。

92. chromID 艰难拟梭菌产色鉴定培养基 该培养基用于鉴定和分离艰难拟梭菌。艰难拟梭菌显色培养基可以帮助机构识别和控制该病原菌传播，可作为全面感染预防方案的一部分。

93. chromID CPS 产色鉴定培养基 CPS 显色琼脂用于分离、计数并直接鉴定大肠埃希菌、变形杆菌、肠球菌和 KESC 群，使用尿标本只需要一个步骤。大肠埃希菌形成粉红至紫红色菌落，变形杆菌形成暗褐色的菌落，肠球菌形成天蓝色菌落。

94. chromID ESBL 产色鉴定培养基 大肠埃希菌在该琼脂上形成粉红色至紫红色的菌落，该琼脂用于筛选产 ESBL 的肠内细菌。KESC 形成绿蓝至棕绿色菌落。变形菌族（变形杆菌、普鲁威登菌和摩根菌）脱氨酶表达菌株形成由深至浅色的棕色菌落。

95. chromID MRSA 产色鉴定培养基 MRSA 菌株呈绿色菌落，这是由于菌落在抗菌药物头孢西丁的存在下产生 α-葡糖醛酸酶。

96. chromID 铜绿假单胞菌产色鉴定培养基 该培养基根据菌落产生氨肽酶而生成特定的紫色来检测铜绿假单胞菌。

97. chromID 沙门菌产色鉴定培养基 该培养基包含三色底物，适用于选择性分离和鉴别所有沙门菌血清型。沙门菌酯酶的酶活性特异性检

测在18～24 h后，无色背景下产浅粉色到紫红色的菌落。

98. chromID金黄色葡萄球菌产色鉴定培养基 该琼脂用于直接鉴定金黄色葡萄球菌和选择性分离葡萄球菌。根据菌落产生β-葡糖苷酶呈绿色可直接鉴定金黄色葡萄球菌。

99. chromID B群链球菌产色鉴定培养基 该培养基用于所有无乳链球菌的筛选。所有GBS在18～24 h后形成圆形、珍珠样、淡粉色至红色的菌落。

100. chromID弧菌产色鉴定培养基 该琼脂用于弧菌的选择性分离，能假设性鉴定霍乱弧菌和副溶血性弧菌。产β-半乳糖苷的蓝绿色菌落假设性鉴定是霍乱弧菌，副溶血性弧菌通过同化阿拉伯糖形成粉红色菌落。

101. chromID VRE产色鉴定培养基 该琼脂用于快速和可靠地定性检测获得性万古霉素耐药的屎肠球菌和粪肠球菌。耐万古霉素屎肠球菌形成紫色菌落，而耐药的粪肠球菌形成蓝色到绿色菌落。

102. 产单核李斯特菌显色培养基 该培养基可根据显色成分鉴别李斯特菌。培养基含有动物组织酶消化物、酪蛋白消化物、丙酮酸钠、葡萄糖、甘油磷酸酯镁、硫酸镁、氯化钠、酵母提取物、硫酸氢二钠、X-葡糖苷显色混合物。抑制剂包括萘啶酸、多黏菌素B、头孢他啶、两性霉素，以及不同成分卵磷脂和L-α-磷脂酰肌醇溶液。

103. 梭状芽胞杆菌琼脂 该培养基用于从混合菌群中选择性分离致病梭状芽胞杆菌。培养基含有消化酪蛋白和大豆粉、葡萄糖、巯基乙酸钠、甲醛次硫酸氢钠、半胱氨酸、叠氮钠和新霉素。

104. 凝固酶甘露醇琼脂 该培养基用于葡萄球菌的培养并根据产生凝固酶和发酵甘露醇情况鉴定金黄色葡萄球菌。该培养基含有消化酪蛋白、甘露醇、脑心浸出液、大豆提取物、血浆和溴甲酚紫。

105. 黏菌素奥索利酸血琼脂 该培养基用于从临床标本的混合菌群中分离和培养链球菌。该培养基以硫酸黏菌素和奥索利酸作为抑制剂。还含有淀粉、牛肉提取物、酵母提取物、消化动物组织和酪蛋白及血液。

106. 哥伦比亚血琼脂 该培养基用于棒状杆菌属、放线菌属、肺炎链球菌、葡萄球菌属及各种苛养菌的培养。该培养基含有淀粉、蛋白胨和血液(通常是5%羊血)。

107. 哥伦比亚CNA琼脂 该培养基用于从临床标本中选择性分离、培养和鉴别革兰阳性球菌。培养基中含有淀粉、蛋白胨和血液。还含有抑制剂黏菌素和萘啶酸。

108. 刚果红酸吗啉丙磺酸着色琼脂 该琼脂培养基用于耶尔森菌属的培养，特别是那些具毒力质粒的菌株。该培养基含有吗啉丙磺酸、酪蛋白氨基酸、半乳糖、甘氨酸、硫代硫酸钠和刚果红。

109. 刚果红脑心浸出液琼脂糖培养基 该培养基用于分离和检测小肠结肠炎耶尔森菌毒力菌株。培养基含有消化的明胶、琼脂糖(代替琼脂)、消化动物的组织、脑心浸出液、葡萄糖、氯化镁和刚果红。

110. 庖肉培养基 该培养基用于厌氧菌的培养，特别是致病性梭杆菌的培养。培养基含有心组织、葡萄糖和消化动物组织。

111. 环丝氨酸-头孢西丁-卵黄-果糖琼脂(艰难拟梭菌琼脂) 该培养基用于从粪便中选择性分离和培养艰难拟梭菌。培养基中含有蛋白胨、果糖、血红素、中性红和蛋黄乳液。也包含抑制剂环丝氨酸和头孢西丁。

112. 半胱氨酸白蛋白肉汤 该培养基用于活检标本的转运和储存以检测幽门螺杆菌。培养基含有半胱氨酸、白蛋白和甘油。

113. 半胱氨酸心浸液琼脂(半胱氨酸-葡萄糖-血琼脂) 该培养基用于培养和保存土拉热带弗朗西丝菌。培养基含有葡萄糖、蛋白胨和牛心浸出液。也包含血红蛋白和胱氨酸。缺乏支持革兰阴性球菌等病原微生物良好生长的丰富的血红蛋白。

114. 胱氨酸-亚碲酸盐-血琼脂 该培养基用于分离、鉴别和培养白喉棒杆菌。培养基含有牛心浸出液、胰蛋白、酵母提取物、胱氨酸、血和亚碲酸钾。白喉棒杆菌呈深灰色至黑色的菌落。

115. 胱氨酸胰蛋白酶琼脂 该培养基用于培养和保存各种苛养菌，包括白喉棒杆菌。也可用在鉴别奈瑟菌属的碳水化合物发酵试验中。培养基含有亚硫酸钠、胱氨酸和消化酪蛋白，以酚红为指示剂。

116. Hajna脱氧胆酸-柠檬酸-乳糖-蔗糖琼脂 该培养基用于从粪便标本中选择性分离沙门菌

属、志贺菌属和弧菌属。该培养基含有柠檬酸、乳糖、蔗糖、硫代硫酸盐、牛肉提取物、脱氧胆酸盐、消化酪蛋白和动物组织及溴甲酚紫。

117. 脱氧胆酸琼脂 该培养基用于从各种临床标本中选择性分离和鉴别革兰阴性菌。培养基含有乳糖、消化酪蛋白和动物组织、柠檬酸铁、柠檬酸钠、脱氧胆酸钠和中性红。大肠埃希菌形成大的、扁平的玫瑰红色菌落。肠杆菌和克雷伯菌属表现为大的、黏液状、中央淡粉色菌落。变形杆菌和沙门菌表现为大的、无色至黄褐色的菌落。志贺菌表现为无色至粉红色菌落。假单孢菌属表现为不规则的、无色至棕色的菌落。

118. 脱氧胆酸柠檬酸盐琼脂 该培养基用于选择性分离和培养肠道病原菌,特别是沙门菌和志贺菌属。培养基中含有柠檬酸、乳糖、消化的动物组织、肉浸出液、脱氧胆酸盐、柠檬酸铁和中性红。

119. Hynes 脱氧胆酸柠檬酸盐琼脂 该培养基用于选择性分离和鉴别肠道病原体,特别是沙门菌属和志贺菌属。培养基含有乳糖、柠檬酸盐、蛋白胨、牛肉提取物、脱氧胆酸盐、柠檬酸铁和中性红。乳糖发酵菌显示为粉红色菌落,有或没有脱氧胆酸沉淀包围。非乳糖发酵菌显示为无色菌落,被一个透明橙黄色的晕包围。

120. 脱氧胆酸-柠檬酸-乳糖-蔗糖(DCLS)琼脂 该培养基用于从粪便标本中选择性分离沙门菌属、志贺菌属和弧菌属。该培养基含有柠檬酸、乳糖、蔗糖、硫代硫酸盐、牛肉提取物、脱氧胆酸盐、消化酪蛋白和动物组织及中性红。

121. D 组链球菌鉴别琼脂 该培养基用于鉴别和鉴定 D 组链球菌。培养基含有消化酪蛋白和动物组织、葡萄糖、脑心浸出液及溴甲酚紫。

122. 含亚碲酸盐和白喉毒力添加剂的白喉毒力琼脂基础 该培养基用于产白喉毒素和白喉棒杆菌毒力株的检测。抗毒素反应实际检测的是白喉毒素。该培养基含有蛋白胨、亚碲酸盐、马血清和一条含有饱和有效白喉抗毒素的滤纸纸条。

123. 含甲苯胺蓝 DNA 酶试验琼脂 该培养基根据产生的 DNA 酶来鉴别细菌,尤其是葡萄球菌属和黏质沙雷菌。培养基含有消化酪蛋白和动物组织、DNA 和甲苯胺蓝。

124. Dubos 肉汤(Dubos 吐温白蛋白肉汤) 该培养基用于结核分枝杆菌和其他分枝杆菌的培养。培养基中含有天冬酰胺、消化酪蛋白、吐温-80、柠檬酸铁铵、血清白蛋白或血清。

125. 大肠埃希菌 O157:H7 MUG 琼脂 该培养基用于从临床标本中分离和鉴别肠出血性大肠埃希菌 O157:H7。培养基中含有蛋白胨、山梨醇、肉提取物、硫代硫酸钠、脱氧胆酸盐、酵母提取物、柠檬酸铁铵、MUG 和溴百里酚蓝。

126. 卵黄琼脂 该培养基用于分离和鉴别梭状芽胞杆菌和其他一些厌氧菌。该培养基含有蛋白胨、葡萄糖、氯化血红素和卵黄乳液。

127. E-M-J-H 培养基 该培养基用于分离和培养钩端螺旋体。培养基以白蛋白和吐温-80 提供脂质,溶解的红细胞提供铁,尚可加入 5-氟尿嘧啶为抑制剂。

128. Levine EMB 琼脂 该培养基用于分离、培养和根据乳糖发酵鉴别革兰阴性肠杆菌。该培养基包含消化酪蛋白、乳糖、蔗糖、曙红、磷酸氢二钾和亚甲蓝。发酵乳糖的细菌,尤其是大肠埃希菌等大肠菌群细菌,形成绿色金属光泽的菌落或蓝黑色至棕褐色菌落。不发酵乳糖的细菌呈无色或透明的浅紫色菌落。

129. Holt-Harris 和 Teague 改良 EMB 琼脂 该培养基用于分离、培养和根据乳糖的发酵鉴别革兰阴性肠杆菌。该培养基包含消化酪蛋白、乳糖、蔗糖、曙红、磷酸氢二钾和亚甲蓝。发酵乳糖的细菌,尤其是大肠埃希菌等大肠菌群细菌,形成绿色金属光泽的菌落或蓝黑色至棕褐色菌落。不发酵乳糖的细菌呈无色或透明的浅紫色菌落。

130. Endo 琼脂 该培养基用于选择性分离、培养和根据乳糖发酵能力鉴别大肠埃希菌和其他肠道菌群。该培养基含有乳糖、消化动物组织和碱性品红。乳糖发酵菌显示为金属光泽的暗红色菌落。非乳糖发酵菌出现无色或半透明的菌落。

131. 肠球菌琼脂 该培养基用于快速选择性分离肠球菌,也用于葡萄球菌和产单核细胞李斯特菌的培养。培养基包含酪蛋白提取物、蛋白胨、铁、七叶苷及酵母提取物。牛胆(汁)和叠氮钠作为抑制剂。培养基中存在柠檬酸铁时,七叶苷水解形成黑褐色菌落。

132. 含万古霉素肠球菌琼脂 该培养基用于耐万古霉素肠球菌(VRE)的检测,特别是对于无症状患者胃肠道中 VRE 的初步筛选。培养基中含有消化酪蛋白、蛋白际-胨、铁、七叶苷及酵母提

取物。牛胆(汁)、叠氮钠和万古霉素(8.0 mol/L)是抑制剂。

133. 肠球菌肉汤 该培养基用于肠球菌的鉴别。培养基中含有消化酪蛋白、蛋白胨、铁、七叶苷和酵母提取物。牛胆(汁)和叠氮钠作为抑制剂。

134. 七叶苷叠氮液 该培养基用于从粪便中培养肠球菌。培养基中含有动物组织、胆盐、酵母提取物、七叶苷、柠檬酸钠、柠檬酸铁铵和叠氮钠。

135. ESP Myco 培养基 该培养基使用 ESP 培养系统Ⅱ(TREK 诊断系统),用于分枝杆菌生长的检测。该培养基在 Middlebrook 7H9 肉汤基础加上富含甘油、酪胨、海绵纤维素。在使用前加入油酸-白蛋白-葡萄糖-触酶(OADC)。

136. Eugonic 琼脂 该培养基用于培养各种苛养菌,如布鲁菌、流感嗜血杆菌、淋病奈瑟菌、巴斯德菌和乳杆菌。培养基含有消化酪蛋白和大豆粉、葡萄糖、胱氨酸和亚硫酸钠。

137. 不含吐温-80 的 Eugonic LT100 培养基基础 该培养基用于苛养菌的培养,如嗜血杆菌、奈瑟菌、巴斯德菌、布鲁菌和乳杆菌。

138. Feeley-Gorman 琼脂 该培养基用于分离和培养嗜肺军团菌。培养基含有酸水解酪蛋白、牛肉提取物、淀粉、半胱氨酸和焦磷酸铁。

139. Fildes 富集琼脂 该培养基用于分离流感嗜血杆菌。培养基含有蛋白胨、牛肉提取物、胃蛋白酶和血。

140. Fletcher 培养基 该培养基用于分离钩端螺旋体。培养基含有蛋白胨、牛肉提取物、胃蛋白酶和血。5-氟尿嘧啶可以为选择性补充剂。

141. 加德纳菌选择琼脂 该培养基用于选择性分离和鉴别临床标本中的阴道加德纳菌。培养基含有蛋白胨、消化酪蛋白、酵母提取物、牛肉提取物,以及支持微生物生长的必需营养。培养基中加入玉米粉以检测菌落的水解活性。溴甲酚紫是酸碱指示剂,琼脂是固化剂。黏菌素、萘啶酸和多黏菌素 B 作为选择剂,抑制阴道加德纳菌和其他能水解淀粉而使培养基呈现黄色的细菌竞争生长。

142. GC 琼脂 该培养基用于从临床标本中分离奈瑟菌属和嗜血杆菌属。培养基含有消化酪蛋白和淀粉,可以加入血红蛋白和辅酶Ⅰ(NAD)补充营养,添加半胱氨酸和抗菌药物使培养基具有选择性。

143. GC Ⅱ琼脂 该培养基用于从临床标本中分离苛养菌,尤其是奈瑟菌属和嗜血杆菌属。培养基中含有消化酪蛋白、肉胨和淀粉。

144. GC-LECT 琼脂 该培养基用于从临床标本中分离和培养淋病奈瑟菌。培养基含有消化酪蛋白、肉胨、淀粉、血红蛋白,选择性补充大量生长因子和专用选择性补充剂。该培养基在《DIFCO&BBL 手册:微生物的脱水培养基和试剂》中所描述[23]。GC-LECT 琼脂用在 Miles 实验室 JEMBEC 系统,包括一个 John E. Martin Biological Environmental Chamber-style 平板、一片二氧化碳片剂及可重复使用的密封塑料袋。

145. GN 肉汤,Hajna 该培养基用于选择性培养沙门菌和志贺菌。培养基中含有消化酪蛋白和动物组织、柠檬酸盐、甘露醇、葡萄糖和脱氧胆酸盐。

146. 胶体李斯特菌培养基/胶体基萘啶酮酸培养基 该培养基用于从临床标本中分离李斯特菌。培养基含有结兰胶、消化酪蛋白和大豆粉、葡萄糖和萘啶酸。

147. H 肉汤 该培养基用于鞭毛抗原的制备,以鉴别和鉴定沙门菌类型和亚型。培养基含有消化酪蛋白、蛋白胨、牛肉提取物和葡萄糖。

148. 嗜血杆菌试验培养基 该培养基用于嗜血杆菌属抗菌药物敏感性试验。培养基中含有消化酪蛋白和动物组织、酵母提取物、高铁血红素、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)和生长因子。

149. HardyCHROM BluEcoli 琼脂 该培养基用于筛选尿标本中的大肠埃希菌。大肠埃希菌菌落变成蓝色。

150. HardyCHROM 碳青霉烯酶琼脂(HardyCHROM CRE 琼脂) 该培养基用于选择和鉴别产碳青霉烯酶的革兰阴性细菌。它作为一种补充培养基或与其他培养基结合应用处理标本。培养基包含蛋白胨、氯化钠、显色混合物、胆汁盐、选择剂和琼脂。显色剂能鉴别产碳青霉烯酶或不产碳青霉烯酶但能失活碳青霉烯的革兰阴性菌,如产头孢菌素酶且孔蛋白缺失的革兰阴性菌。不用于卫生保健机构预防和控制碳青霉烯类耐药细菌的明确鉴定。该培养基没有被美国 FDA 批准用于对碳青霉烯耐药细菌感染的诊断。存储和孵育时应避光。

151. HardyCHROM EEC 琼脂 该培养基用于检测、鉴定及定量大肠埃希菌。与 BHI 肉汤联合使用可检测直肠拭子标本中耐氟喹诺酮细菌。培养基含有蛋白胨、氯化钠、显色剂、选择剂和琼脂。

152. HardyCHROM ESBL 琼脂 该培养基用于选择和鉴别产 ESBL 的肠杆菌科细菌。它作为一种补充培养基或与其他培养基结合应用处理疑有产 ESBL 菌，尤其是肠杆菌科细菌的粪便标本。该培养基应该用于筛查，而不是明确鉴定可疑定植有产 ESBL 细菌的患者。培养基含有蛋白胨、氯化钠、显色混合剂、抑制剂、选择剂和琼脂。该培养基没有被美国 FDA 批准用于由产 ESBL 细菌引起的感染的诊断。

153. HardyCHROM MRSA 该培养基帮助分离鉴定 MRSA，可用于检测鼻窦中定植的 MRSA 及甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌。

154. 沙门菌 HardyCHROM 琼脂 该培养基有助于从肠杆菌科细菌中分离和鉴别沙门菌。

155. HardyCHROM SS 琼脂 该培养基用于粪便标本中分离鉴定沙门菌和志贺菌的初步筛选，通过菌落颜色可区分非致病的肠道细菌。

156. 金黄色葡萄球菌 HardyCHROM 琼脂 该培养基用于分离、鉴别和定量金黄色葡萄球菌，能在 24 h 内从临床标本中快速、准确检测金黄色葡萄球菌。

157. Hartley 消化肉汤 该培养基用于分离和培养放线菌。培养基含有牛心、胰酶、碳酸钠和盐酸。

158. 心浸出液琼脂 该培养基用于分离和培养多种微生物，包括蜡样芽胞杆菌、金黄色葡萄球菌、创伤弧菌和霍乱弧菌。培养基含有胰蛋白和牛心浸出液。它可以作为血琼脂基础以确定溶血反应。

159. HE 琼脂 该培养基用于根据乳糖或蔗糖发酵和产生硫化氢情况，从多种临床标本中分离和培养革兰阴性肠杆菌。发酵乳糖或蔗糖的细菌显示为黄色至橙色菌落，产生硫化氢细菌显示为带黑色中心的菌落。该培养基含有乳糖、消化动物组织、蔗糖、胆汁盐、硫代硫酸盐、酵母提取物、水杨苷柠檬酸铁铵、酸性品红和溴百里酚蓝。

160. HiCrome 黄色葡萄球菌卵黄亚碲酸盐琼脂基础(金黄色葡萄球菌琼脂，HiCrome) 该培养基用于凝固酶阳性金黄色葡萄球菌的分离和计数。凝固酶阳性的金黄色葡萄球菌是棕黑色菌落，而表皮葡萄球菌是略带褐色的黄色菌落。培养基含有消化酪蛋白和明胶、丙酮酸、牛肉提取物、氯化锂、酵母提取物、蛋、亚碲酸盐和显色混合物。

161. 含拉氧头孢的改良李斯特菌 HiCrome 琼脂基础(改良李斯特菌 HiCrome 琼脂基础) 该培养基用于快速和直接识别李斯特菌，特别是产单核细胞李斯特菌。该培养基含有蛋白胨、鼠李糖、氯化锂、肉提取物、酵母提取物、酚红和显色混合物。还包括拉氧头孢作为选择性补充剂。

162. HiCrome MeReSa 甲氧西林琼脂 该培养基用于分离和培养 MRSA。培养基中含有显色底物，能鉴别金黄色葡萄球菌，还含有甲氧西林。

163. HiCrome RajHans 培养基(沙门菌琼脂) 该培养基用于沙门菌的鉴定和与肠杆菌科成员尤其是变形杆菌的鉴别。培养基含有发色混合物可以初步鉴别。

164. HiCrome 沙门菌琼脂 该培养基用于从尿等可能包含大量变形杆菌及其他潜在的致病性革兰阳性细菌的样本中鉴定、鉴别和确认大肠埃希菌和沙门菌等肠道细菌，培养基中含有消化动物组织、酵母提取物、胆盐和显色混合物。

165. HiCrome UTI 琼脂 该培养基用于鉴别和计数通过膜过滤的水中耐热大肠埃希菌，也可用鉴定、鉴别和确认尿、水或食物等可能包含大量变形杆菌及其他潜在的致病性革兰阳性细菌的肠道细菌。培养基中含有消化酪蛋白、动物组织、牛肉膏和显色混合物。

166. HiFluoro 假单胞菌琼脂基础 该培养基用于从临床标本中通过荧光方法选择性分离铜绿假单胞菌。培养基含有消化明胶、硫酸钾、甘油、溴化十六烷基三甲铵和荧光混合物。

167. Horie 阿拉伯糖乙基紫肉汤 该培养基用于弧菌的培养。培养基含有蛋白胨、牛肉提取物、阿拉伯糖、乙基紫和溴百里酚蓝。

168. Hoyle 培养基 该培养基用于分离和鉴别白喉棒杆菌菌株。所有白喉棒杆菌能非常迅速地增长，诊断可在孵育 18 h 后进行。培养基中含有蛋白胨、Lab-Lemco 粉、亚碲酸盐和红细胞溶解的血。

169. 卡那霉素-七叶苷-叠氮化物琼脂 该培

养基用于肠球菌的分离。该培养基含有消化酪蛋白、酵母提取物、七叶苷、柠檬酸钠、柠檬酸铁铵、叠氮钠和卡那霉素。

170. 克氏双糖铁琼脂 该培养基用于鉴别革兰阴性杆菌。它含有不同浓度的葡萄糖和蔗糖，可以分别判定这2种糖的发酵情况。同时，该培养基也含有H_2S产物指示剂，由亚硫酸盐还原酶与硫代硫酸盐产生的H_2S与铁盐反应生成的浓黑色FeS沉淀。

171. LIM肉汤 该培养基是改良的Todd-Hewitt肉汤，是选择性增菌培养基，用于分离和培养无乳链球菌。蛋白胨、盐和葡萄糖提供营养基础。酵母提取物提供B族维生素和额外的补充，黏菌素和萘啶酸抑制革兰阴性菌。Elsayed等已评价了这一培养基的作用[38]。

172. 牛津李斯特菌培养基基础，添加抗生素抑制剂 该培养基用于从含有混合细菌的样品，包括从病理样本中分离和培养产单核细胞李斯特菌。该培养基含有蛋白胨、氯化锂、淀粉、七叶苷和柠檬酸铵铁，还包括放线菌酮、硫酸黏菌素、磷霉素、吖啶黄和头孢替坦作为抑制剂。

173. 李斯特菌增菌转运培养基 该培养基作为转运培养基用于维持李斯特菌的菌量。培养基含有甘油磷酸钠、巯基乙酸钠、萘啶酸和吖啶。

174. 肝浸出液琼脂 该培养基用于布鲁菌和其他苛养致病菌的培养。培养基含有硫氰酸钾、牛肝浸出液、蛋白胨和盐。

175. 产单核细胞李斯特菌确证琼脂基础 该培养基用于从临床标本中选择性分离产单核细胞李斯特菌。培养基含有蛋白胨、氯化锂、酵母提取物、α-甲基-D-甘露糖、磷脂酰肌醇、多黏菌素B、头孢他啶、萘啶酸和两性霉素B等多种抗菌药物，使该培养基具有高度选择性。

176. Loeffler培养基 该培养基用于白喉棒杆菌的检测。培养基中含有牛血清、鸡蛋、心肌浸出液、葡萄糖和消化动物组织。

177. Lombard-Dowell琼脂 该培养基用于鉴定各种专性厌氧细菌，包括拟杆菌属、梭杆菌属、梭状芽胞杆菌属和无芽胞的革兰阳性厌氧菌。培养基包含消化酪蛋白、酵母提取物、胱氨酸、色氨酸、亚硫酸钠、氯化血红素和维生素K_1。

178. Lombard-Dowell卵黄琼脂 该培养基用于培养各种厌氧菌，并根据产生卵磷脂、脂肪酶和蛋白水解的能力鉴别厌氧菌。该培养基含有消化酪蛋白、酵母提取物、胱氨酸、色氨酸、亚硫酸钠、卵黄乳剂、氯化血红素和维生素K_1。产生卵磷脂的细菌出现由不溶性沉淀物包围的菌落，产生脂肪酶的细菌出现珍珠般彩色光泽菌落，产生蛋白水解活性的细菌菌落被透明区域包围。

179. Lowenstein-Gruft培养基 该培养基用于培养和鉴别结核分枝杆菌。培养基中含有淀粉、天冬酰胺、柠檬酸镁、孔雀石绿、萘啶酸、RNA、鸡蛋、甘油和青霉素。结核分枝杆菌表现为颗粒状、粗糙、干燥的菌落，堪萨斯分枝菌表现为光滑到粗糙、光产色菌落，戈登分枝菌表现为光滑、橙黄色的菌落，鸟胞分枝杆菌表现为光滑、无色菌落。耻垢杆菌表现为褶皱、乳白色菌落。

180. Lowenstein-Jensen培养基 该培养基用于培养和鉴别结核分枝杆菌。培养基中含有淀粉、天冬酰胺、柠檬酸镁、孔雀石绿、鸡蛋和甘油。结核分枝杆菌表现为颗粒状、粗糙、干燥的菌落，堪萨斯分枝杆菌表现为光滑到粗糙、光照产色的菌落，戈登分枝杆菌表现为光滑、橙黄色的菌落，鸟胞分枝杆菌表现为光滑、无色菌落，耻垢分枝杆菌表现为褶皱、乳白色菌落。

181. 麦康凯琼脂 该培养基是根据发酵乳糖的能力选择性分离和鉴别大肠菌群和肠道病原体。该培养基含有明胶提取物、消化酪蛋白和动物组织、乳糖、胆盐、中性红和结晶紫。乳糖发酵细菌显示为红色或粉红色菌落。不发酵乳糖细菌表现为无色或透明的菌落。

182. 麦康凯琼脂，Fluorocult（Fluorocult麦康凯琼脂） 该培养基用于从各种标本中分离沙门菌、志贺菌和大肠菌群尤其是大肠埃希菌。该培养基包含明胶提取物、乳糖、胆汁盐、消化酪蛋白和动物组织、中性红、结晶紫和MUG。胆盐和结晶紫在很大程度上抑制革兰阳性菌的生长。乳糖和pH指示剂中性红是用来检测乳糖阳性菌落，大肠埃希菌可以在紫外光下发荧光。

183. 山梨醇麦康凯琼脂 该培养基用于选择性分离和鉴别大肠埃希菌O157：H7。培养基包含明胶提取物、胆汁盐、消化酪蛋白和动物组织、中性红、结晶紫和山梨糖醇。STEC菌株不发酵山梨糖醇，显示为无色菌落。发酵山梨糖醇菌株显示为粉红色菌落。

184. 孔雀石绿肉汤 该培养基用于铜绿假单

胞菌的培养。培养基中含有蛋白胨、牛肉提取物和孔雀石绿。

185. 甘露醇卵黄多黏菌素琼脂 该培养基用于从临床标本中培养和计数蜡样芽胞杆菌。培养基含有甘露醇、蛋白胨、牛肉提取物、酚红、多黏菌素B和卵黄乳液。

186. 甘露醇-赖氨酸-结晶紫-亮绿琼脂 该培养基用于从粪便中选择性分离和培养沙门菌。该培养基含有蛋白胨、酵母提取物、赖氨酸、硫代硫酸钠、甘露醇、牛肉膏、柠檬酸铁铵、结晶紫和亮绿。

187. 甘露醇盐琼脂 该培养基用于从临床标本中选择性分离、培养和计数葡萄球菌。培养基中含有甘露醇、消化酪蛋白和动物组织、牛肉膏和酚红。利用甘露醇的生物体使培养基变为黄色。

188. 甘露醇盐肉汤 该培养基用于初步选择性分离致病性葡萄球菌。培养基中含有蛋白胨、甘露醇、牛肉提取物和酚红。

189. 甘露醇亚硒酸盐肉汤(亚硒酸盐甘露醇肉汤) 该培养基用于临床标本中沙门菌属的选择性增菌。培养基含有消化动物组织、甘露醇和亚硒酸钠。

190. 马丁-刘易斯(Martin-Lewis)琼脂 该培养基用于从含有混合菌标本中分离和培养致病的奈瑟菌。培养基含有血红蛋白、消化酪蛋白、牛肉胨和淀粉。还包含有复合的氨基酸增长补充溶液、核苷酸和维生素。黏菌素、甲氧苄啶、乳酸盐、万古霉素和茴香霉素作为抑制剂。

191. 麦克布赖德(McBride)李斯特菌琼脂 该培养基用于从含有混合菌的临床标本中选择性分离产单核细胞李斯特菌。培养基中含有甘氨酸、消化酪蛋白、消化动物组织、牛肉提取物、苯乙醇和氯化锂。

192. 甲基红-VP培养基 该培养基用于鉴别产酸(甲基红试验)和产生3-羟基丁酮(VP反应)的细菌。培养基含有葡萄糖、蛋白胨和磷酸盐缓冲液。

193. ADC增菌Middlebrook 7H9肉汤 该培养基用于分离分枝杆菌属,包括结核分枝杆菌,还用于分枝杆菌药敏试验。该培养基包含谷氨酸盐、柠檬酸盐、柠檬酸铁铵、吡哆醇、生物素、甘油和Middlebrook ADC增菌培养基。

194. ADC增菌Middlebrook 7H10琼脂 该培养基用于分离、培养和保存分枝杆菌,包括结核分枝杆菌,还用于分枝杆菌的药敏试验。培养基中含有谷氨酸盐、柠檬酸盐、柠檬酸铁铵、吡哆醇、生物素、甘油、孔雀石绿和MiddlebrookADC增菌培养基。

195. Middlebrook ADC增菌7H11琼脂(Middlebrook ADC增菌分枝杆菌7H11琼脂) 该培养基用于耐药(异烟肼)结核分枝杆菌菌株的培养,特别用于肺结核患者应用二代抗结核药治疗之后的结核菌苛养株的培养。通常这些菌株在7H10培养基不能生长。7H11培养基中含有谷氨酸盐、柠檬酸盐、柠檬酸铁铵、吡哆醇、生物素、甘油、孔雀石绿和Middlebrook ADC增菌培养基。

196. Middlebrook白蛋白-葡萄糖-触酶(ADC)增菌培养基 该培养基是其他Middlebrook培养基的补充,用于分离、培养和保存结核分枝杆菌。也可以作为分枝杆菌药敏试验的补充。培养基含有牛白蛋白组分Ⅴ、葡萄糖和触酶。

197. Middlebrook,富含OADC 该培养基用作其他Middlebrook培养基补充剂,用于分离、培养和保存结核分枝杆菌。也可以用来作为其他Middlebrook培养基补充剂,用于分枝杆菌的药敏试验。这种具有增菌作用的补充剂含有牛白蛋白组分Ⅴ、葡萄糖、油酸和触酶。

198. MOD4 该培养基用于快速培养结核分枝杆菌。包含Middlebrook 7H10琼脂、Middlebrook OADC补充剂、酵母提取物、葡萄糖、酪蛋白胰酶消化物、甘油、吐温-80、万古霉素、多黏菌素B、两性霉素B、萘啶酸、甲氧苄啶、阿洛西林、全血、热失活胎牛血清及严格的细菌补充剂。

199. MOD9 该培养基可从临床标本中快速培养结核分枝杆菌[39]。包含Middlebrook 7H10琼脂、Middlebrook OADC补充剂、酵母提取物、葡萄糖、胰消化物酪蛋白、甘油、吐温-80、万古霉素、多黏菌素B、两性霉素B、萘啶酸、甲氧苄啶、阿洛西林、热失活羊血清、严格的细菌补充剂、抗坏血酸,偶氮玉红和朱红混合剂使培养基呈红色,分枝杆菌的白色菌落更加明显。

200. MRS琼脂(DeMan-Rogosa-Sharpe琼脂,乳杆菌MRS琼脂) 该培养基用于从临床标本中分离和培养乳杆菌。它含有明胶消化物、牛肉提取物、酵母提取物、乙酸钠、柠檬酸铵和吐温-80。

201. MRSA选择培养基 这是一种选择鉴别

培养基(Bio-Rad Laboratories，Redmond，WA)，用于检测对鼻拭子和伤口标本MRSA。

202. Mueller-Hinton琼脂(M-H琼脂) 该培养基用于分离致病奈瑟菌属，包括脑膜炎奈瑟菌，也可用于各种细菌的药敏试验。培养基含有牛肉浸液、酸水解酪蛋白和淀粉。

203. Mueller-Hinton Ⅱ琼脂 该培养基用于各种细菌Bauer-Kirby纸片扩散法药敏试验。培养基中含有酸水解酪蛋白和淀粉。该培养基加入5%绵羊血，被推荐用于肺炎链球菌和流感嗜血杆菌的药敏检测。

204. M-H肉汤 该培养基用于药敏试验。培养基含有牛肉浸出液、酸水解酪蛋白和淀粉。

205. M-H巧克力琼脂 该培养基用于淋病奈瑟菌和脑膜炎奈瑟菌的培养及苛养菌的药敏试验。培养基含有牛肉浸液、酸水解酪蛋白、淀粉和血液。

206. M-H亚碲酸盐培养基 该培养基用于分离、培养和鉴别白喉棒杆菌。培养基中含有酪蛋白、酪蛋白氨基酸、色氨酸、血清、乳酸钠、乙醇、泛酸钙和亚碲酸盐。

207. Mycobactosel琼脂 该培养基用于从混合菌标本中选择性分离分枝杆菌。培养基含有消化酪蛋白、白蛋白、谷氨酸盐、生物素、甘油、油酸、触酶和孔雀石绿。还包含放线菌酮、萘啶酸和林可霉素作为抑制剂。

208. Mycobactosel L-J培养基 该培养基用于从临床标本分离和培养结核分枝杆菌。该培养基含有马铃薯粉、天冬酰胺、柠檬酸盐、甘油、孔雀石绿和鸡蛋。还包含放线菌酮、萘啶酸和林可霉素作为抑制剂。Mycobactosel L-J培养基是在Lowenstein-Jensen培养基中加放线菌酮、林可霉素和萘啶酸，用于含许多污染菌的标本。

209. 支原体琼脂基础(PPLO琼脂基础) 该培养基用于支原体属培养的准备培养基中。培养基中含有消化酪蛋白、牛肉提取物、酵母提取物、牛心浸出液、马血清及新鲜酵母提取液。

210. 不含结晶紫的腹水支原体肉汤基础(无结晶紫PPLO肉汤基础) 该培养基是用于临床标本中支原体属的增菌。培养基中含有蛋白胨、牛肉和腹水液。

211. 氯化钠琼脂 该培养基根据耐盐性鉴别革兰阳性球菌，特别是葡萄球菌。培养基含有不同浓度的氯化钠(如6.5%或12%)、消化酪蛋白和大豆粉。还可以补充葡萄糖和羊血。

212. 脑膜炎奈瑟菌培养基 该培养基用于选择性分离和培养脑膜炎奈瑟菌。培养基含有酸羟化的酪蛋白和淀粉。万古霉素、多黏菌素、制霉菌素作为抑制剂。

213. 新霉素血琼脂 该培养基用于从咽喉培养物及其他临床标本分离和培养A群链球菌(化脓链球菌)和B群链球菌(无乳链球菌)。该培养基含有消化酪蛋白、生长因子、血和新霉素。

214. New York City培养基 该培养基用于分离和培养致病奈瑟菌。可以用来作为泌尿生殖系统和其他临床标本的转运培养基，也用于从泌尿生殖系统标本中分离和假设性鉴定支原体，包括肺炎支原体(大菌落)和T-支原体(译者注：即解脲脲原体)。该培养基含有淀粉、蛋白胨、葡萄糖、血浆和血液，黏菌素、甲氧苄啶和万古霉素作为抑制剂。

215. 硝酸盐肉汤 该培养基根据还原硝酸盐的能力鉴别需氧和兼性厌氧革兰阴性菌。培养基中含有消化明胶和硝酸钾。氨基苯磺酸和萘胺试剂用于硝酸盐试验。细菌将硝酸盐还原为亚硝酸盐，培养基变红色。

216. 1.5%腹水HiVeg营养琼脂 该培养基用于临床标本中支原体属的增菌剂。培养基含有蛋白胨和腹水。

217. N-Z胺A甘油琼脂 该培养基用于分离和培养放线菌属。培养基含有N-Z-胺A、牛肉提取物和甘油。

218. O157:H7鉴定琼脂 这是bioMérieux专有显色培养基，用于检测大肠埃希菌O157:H7。

219. ONE李斯特菌肉汤(Oxoid公司新李斯特菌增菌肉汤) 该培养基用于李斯特菌属的选择性增菌。这是Oxoid公司专有的培养基，培养基中含有蛋白胨、混合盐、混合糖和选择性补充剂。

220. Önöz沙门菌琼脂 该培养基用于从粪便中分离和培养沙门菌。培养基含有蔗糖、乳糖、柠檬酸钠、牛肉胨、牛肉提取物、苯丙氨酸、硫代硫酸钠、胆盐、酵母提取物、柠檬酸铁、偏铬黄、苯胺蓝、中性红和亮绿。

221. 牛津琼脂(李斯特菌选择性琼脂，牛津) 该培养基用于从含有混合菌的样本中分离和

培养单核细胞性李斯特菌。培养基中含有蛋白胨、淀粉、七叶苷、柠檬酸铁铵、氯化锂及杀菌药放线菌酮、多黏菌素、磷霉素、吖啶黄和头孢替坦。

222. 改良牛津琼脂(李斯特菌选择性琼脂,改良牛津) 该培养基用于从含有混合细菌的样本中分离李斯特菌。该培养基含有蛋白胨、氯化锂、淀粉、七叶苷、柠檬酸铁铵及杀菌药拉氧头孢和硫酸黏菌素。

223. Hugh-Leifson 氧化-发酵培养基 该培养基利用氧化和发酵碳水化合物的能力鉴别革兰阴性菌,如弧菌属。该培养基含有蛋白胨、碳水化合物、溴百里酚蓝。发酵碳水化合物的细菌使培养基变黄色。

224. King 氧化-发酵培养基 该培养基根据氧化和发酵代谢碳水化合物的能力鉴别细菌。培养基中含有消化酪蛋白、碳水化合物基质和酚红。细菌发酵碳水化合物后变成黄色。

225. 氧化-发酵多黏菌素-杆菌肽乳糖 该培养基用于培养洋葱伯克霍德菌复合群和快生长的分枝杆菌。该培养基含有酪蛋白酶水解物、磷酸氢二钾、乳糖、溴百里酚蓝和琼脂。

226. 牛津沙门菌显色培养基(OSCM) 该培养基用于鉴定沙门菌属,并与其他肠杆菌科相鉴别。该培养基利用两种显色剂检测沙门菌,分别是 5-溴 6-氯-3-吲哚辛酸盐(品红辛酸酯)和 5-溴-4-氯-3-吲哚基-βD 吡喃半乳糖苷(X-gal)。X-gal 是 β-D 半乳糖苷酶的底物。乳糖阴性沙门菌水解显色剂品红辛酸,形成洋红色的菌落。胆盐用于抑制革兰阳性细菌生长,加入补充抑制剂能增加培养基的选择性。新生霉素抑制变形杆菌的生长,头孢磺啶抑制假单胞菌生长。

227. P 琼脂 该培养基用于葡萄球菌属的培养。培养基中含有蛋白胨、氯化钠、酵母提取物和葡萄糖。

228. 溶血巴斯德菌选择性培养基 该培养基用于选择性培养溶血巴斯德菌。培养基中含有消化酪蛋白和动物组织、葡萄糖、经胃酶消化的血和放线菌酮、新生霉素和新霉素。

229. 产青霉素酶淋病奈瑟菌培养基(PPNG 选择性培养基) 该培养基用于鉴别和假设性鉴定产青霉素酶的淋病奈瑟菌菌株。PPNG 选择性培养基是 2 个扇形平板,每个含有不同的 Martin-Lewis 琼脂。

230. 蛋白胨铁琼脂 该培养基用于培养和利用它们产生硫化氢的能力鉴别细菌。培养基中含有蛋白胨、甘油磷酸钠、柠檬酸铁铵和硫代硫酸钠。产生硫化氢的细菌为黑色菌落。

231. 产气荚膜梭菌琼脂(Shahidi-Ferguson 产气荚膜梭菌琼脂) 该培养基用于产气荚膜梭菌的分离和计数,菌落被黑色沉淀包围。培养基含有胰蛋白、消化大豆粉、酵母提取物、柠檬酸铁铵、亚硫酸钠、卵黄乳剂、卡那霉素、硫酸多黏菌素。

232. Petragnani 培养基 该培养基用于从临床标本中分离和培养结核分枝杆菌。特别是用于培养和维持耻垢分枝杆菌。该培养基含有牛奶、土豆粉、天冬酰胺、消化酪蛋白、鸡蛋、甘油和孔雀石绿。

233. 含甘油、卵黄、葡萄糖和孔雀石绿的 Pfizer TB 培养基基础 该培养基用于结核分枝杆菌的培养。培养基中含有淀粉、消化酪蛋白、牛肉提取物、天冬酰胺、柠檬酸、柠檬酸铁铵、卵黄、甘油、葡萄糖和孔雀石绿。

234. PGT 培养基 该培养基用于培养和维持白喉棒杆菌。培养基中含有酪蛋白氨基酸、谷氨酸、麦芽糖、半胱氨酸、色氨酸、泛酸盐、硫酸亚铁和生长因子复合物。

235. 苯乙醇琼脂(phenylethanol agar, phenylethyl alcohol agar) 该培养基用于从含有混合菌的标本中选择性分离革兰阳性菌,特别是革兰阳性球菌。该培养基不用于观察溶血反应。培养基含有酪蛋白和大豆粉、消化血液和苯乙醇。添加拉氧头孢和氯化锂作为抑制剂。

236. 酚红琼脂 该培养基用于测定发酵反应。培养基中含有蛋白胨、牛肉提取物、碳水化合物基质和酚红。发酵醣类细菌转为黄色。

237. 酚红酒石酸肉汤 该培养基利用发酵酒石酸盐的能力鉴别革兰阴性肠杆菌,尤其是沙门菌成员(副伤寒沙门菌)。该培养基含有消化酪蛋白、酒石酸盐和酚红。

238. Pike 链球菌肉汤 该培养基用于从咽拭子等临床标本中分离溶血性链球菌和增菌。培养基中含有消化酪蛋白、胰蛋白、酵母提取物、葡萄糖、叠氮钠、血液和结晶紫。细菌在该培养基中培养 18～24 h 后,可在血琼脂平板上分离。

239. PLET 琼脂 该培养基用于选择性分离

和培养炭疽芽胞杆菌。培养基含有牛心浸出液、胰蛋白、EDTA、醋酸铊、溶菌酶和多黏菌素B。

240. 亚碲酸钾琼脂 该培养基用于培养和鉴别粪肠球菌。培养基中含有牛心浸出液、胰蛋白、血、亚碲酸钾。粪肠球菌出现黑色的菌落。

241. PPLO琼脂(支原体琼脂) 该培养基用于分离和培养支原体属(*Mycoplasma* spp.)。培养基含有牛心浸出液、蛋白胨和血清。

242. 甘油假单胞菌分离琼脂 该培养基用于从临床标本选择性分离和鉴定铜绿假单胞菌。该培养基有蛋白胨、氯苯酚和甘油。

243. 彩虹琼脂O157 这是Biolog公司专有培养基，用于检测和假设性鉴定产毒素大肠埃希菌菌株，特别是O157:H7。培养基含有两个大肠埃希菌相关的酶显色底物：β-半乳糖苷(蓝黑色显色底物)和β-葡糖醛酸酶(红色显色底物)。在培养皿白色背景下容易观察到独特的黑色或灰色的大肠埃希菌O157:H7菌落。大肠埃希菌O157:H7为浅蓝色菌落，被无毒力的粉红色或紫红色菌落包围。加入选择性抑制剂能增加培养基的性能，加入后大肠埃希菌O157:H7菌落色彩会偏蓝。亚碲酸盐对大肠埃希菌O157:H7有高度选择性，并且可以大大减少非目标菌。新生霉素抑制变形杆菌迁徙，抑制亚碲酸盐还原菌生长，O157:H7是罕见的亚碲酸盐敏感株。

244. 沙门菌彩虹琼脂 这是Biolog公司专有的选择性培养基，显色培养基有助于检测和分离产生硫化氢的沙门菌。即使是产生少量硫化氢的细菌也能形成黑色菌落。

245. RajHans培养基(改良HiCrome沙门菌培养基) 该显色培养基用于从变形杆菌等肠杆菌科中分离和鉴别沙门菌。培养基含有酪蛋白水解物、酵母提取物、动物组织、乳糖、脱氧胆酸钠、中性红和显色混合剂。

246. RAMBACH琼脂(CHROMagar Rambach) 该培养基用于肠道细菌的检测，包括大肠菌群和沙门菌。脱氧胆酸钠抑制革兰阳性菌的生长。培养基中含有聚丙二醇、蛋白胨、脱氧胆酸盐和显色混合物。这使沙门菌与其他细菌明确区分。沙门菌变成红色。大肠埃希菌分解β-半乳糖苷为蓝绿色或蓝紫色菌落。其他肠杆菌科和革兰阴性细菌，如变形杆菌、假单胞菌属、志贺菌、伤寒沙门菌和甲型副伤寒沙门菌为无色至黄色菌落。

247. 快速发酵培养基 该培养基用于临床标本中奈瑟菌属的鉴别。培养基含有消化酪蛋白、胱氨酸、亚硫酸钠和酚红。

248. 分枝杆菌快速生长培养基 该培养基用于从囊性纤维化患者痰中分离快速生长的分枝杆菌[40]，是改良的Middlebrook 7H9肉汤。培养基含有硫酸铵、L-谷氨酸、磷酸二钠、磷酸二氢钾、柠檬酸钠、硫酸镁、氯化钙、生物素、硫酸铜、硫酸锌、维生素B_6、枸橼酸铁铵、甘油、酵母提取物和琼脂。琼脂中含有OADC补充剂(牛血清白蛋白、葡萄糖、触酶、油酸)；抑菌剂有黏菌素(如黏菌素甲磺酸盐)、磷霉素、葡糖-6-磷酸、两性霉素、C-390。

249. 含炭Regan-Lowe琼脂(Regan-Lowe培养基) 该培养基用于临床标本中百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌的选择性分离。该培养基含有牛肉膏、消化明胶、淀粉、炭、烟酸、血液和头孢氨苄。

250. Regan-Lowe半固体转运培养基 该培养基用于临床标本中百日咳鲍特菌转运和副百日咳鲍特菌的分离。该培养基含有牛肉膏、消化明胶、淀粉、炭、烟酸、血液和头孢氨苄。

251. 沙门菌显色琼脂(OSCM) 参见牛津沙门菌显色琼脂。

252. 沙门菌志贺菌琼脂(SS琼脂) 该培养基用于选择性分离和鉴别致病肠道杆菌，特别是沙门菌属。该培养基不建议用于志贺菌的初步分离。该培养基中含有乳糖、胆盐、硫代硫酸盐、柠檬酸盐、牛肉提取物、消化酪蛋白、动物组织、柠檬酸铁、中性红和亮绿。乳糖发酵菌如大肠埃希菌或肺炎克雷伯菌显示为小的粉红色或红色菌落。不发酵乳糖的细菌如沙门菌属、变形杆菌属、志贺菌属显示为无色菌落。产生H_2S的沙门菌属菌落中心呈黑色。

253. 高盐肉汤 该培养基用于含混合菌群的临床标本，如粪便标本，特别是在金黄色葡萄球菌食物中毒调查时葡萄球菌的分离和培养，培养基中含有10%的氯化钠、牛心组织、牛肉提取物和蛋白胨。

254. 耐盐培养基 该培养基用于培养和分离耐盐链球菌属、葡萄球菌属和其他耐盐革兰阳性球菌。培养基含有6.5%氯化钠、牛心浸出液、胰蛋白、葡萄糖和溴甲酚紫。

255. SA选择培养基 该培养基为检测各种

临床标本中金黄色葡萄球菌的选择性和鉴别培养基(Bio-Rad 实验室),包括脓汁、伤口、呼吸道分泌物、鼻拭子和血培养标本。

256. 金黄色葡萄球菌鉴定培养基 这是bioMérieux公司的专有培养基,用于直接识别金黄色葡萄球菌和选择性分离葡萄球菌。直接识别金黄色葡萄球菌是基于产 β-葡糖苷酶菌落自然呈现绿色。

257. Schaedler 琼脂(Schaedler 厌氧琼脂) 该培养基用于需氧菌和厌氧菌的分离培养。培养基含有葡萄糖、消化酪蛋白和大豆粉、蛋白胨、酵母提取物、Tris 缓冲液、胱氨酸和氯化血红素。

258. 含维生素 K_1 和绵羊血的 Schaedler CNA 琼脂 该培养基是厌氧革兰阳性球菌的选择性分离培养基。培养基中含有消化酪蛋白、动物组织和大豆粉、葡萄糖、酵母提取物、胱氨酸、氯化血红素、黏菌素、萘啶酸、血液和维生素 K_1。

259. Schleifer-Krämer 琼脂 该培养基用于分离和培养葡萄球菌属。该培养基含有甘油、丙酮酸盐、消化酪蛋白、牛肉提取物、酵母提取物、异硫氰酸钾、氯化锂、甘氨酸和叠氮钠。

260. 亚硒酸肉汤(亚硒酸 F 肉汤) 该培养基用于从临床标本中分离和增菌培养沙门菌。培养基含有消化酪蛋白、乳糖和亚硒酸氢钠。

261. 甘露醇亚硒酸基础肉汤 该培养基用于分离和培养伤寒沙门菌和副伤寒沙门菌。该培养基含有蛋白胨、甘露醇和亚硒酸钠。

262. 亚硒酸胱氨酸肉汤 该培养基用于分离和培养粪便中沙门菌属。培养基中包含消化酪蛋白、乳糖、胱氨酸和亚硒酸钠。

263. 血清葡萄糖琼脂 该培养基用于保存布鲁菌属,并作为化脓链球菌的转运培养基。该培养基含有蛋白胨、牛肉膏、血清和葡萄糖。

264. 血清亚碲酸盐琼脂 该培养基用于分离和培养棒杆菌属,尤其是在实验室诊断白喉。培养基中含有消化酪蛋白、动物组织、葡萄糖、羊血清和亚碲酸盐。

265. SIM 培养基 该培养基基于硫化氢、吲哚的产生和细菌动力,用于鉴别肠杆菌科。培养基含有蛋白胨、牛肉提取物、胨化铁、硫代硫酸钠。

266. 西蒙柠檬酸盐琼脂(柠檬酸盐琼脂) 该培养基根据柠檬酸盐利用情况鉴别革兰阴性菌。该培养基包含柠檬酸盐、磷酸盐缓冲液和溴酚蓝。利用柠檬酸盐作为唯一碳源的细菌,培养基变成蓝色。该培养基在 pH 6.0 时是黄色, pH 6.9 时为绿色,pH 7.6 时为蓝色。

267. Skirrow 布鲁菌培养基 该培养基用于选择性分离和培养弯曲杆菌属。培养基中含有蛋白胨、酵母提取物、肝细胞浸出液和血液。还包含万古霉素、甲氧苄啶和多黏菌素 B 作为抑制剂。

268. 马尿酸钠肉汤(马尿酸盐肉汤) 该培养基根据马尿酸水解情况鉴定和鉴别 β-溶血性链球菌。培养基中含有牛心浸出液、胰蛋白和马尿酸钠。接种和孵育后,试管中加入三氯化铁试剂,10~15 min 后大量的沉淀生成,表示马尿酸盐已经水解。

269. 含 5-溴-4-氯-3-吲哚基 β-D-葡糖苷酸山梨醇麦康凯琼脂(BCIG) 该培养基是一种选择鉴别培养基,用于检测与显色底物 BCIG 结合的大肠埃希菌 O157:H7。该培养基结合了筛选大肠埃希菌 O157:H7 两种不同的机制,发酵山梨醇和缺乏 β-葡糖醛酸酶活性。不发酵山梨醇和 β-葡糖醛酸酶阴性的大肠埃希菌 O157:H7 将呈现草绿色菌落。有 β-葡糖醛酸酶活性的细菌分解底物,呈现蓝绿色的菌落。

270. 0.1%琼脂大豆培养基(0.1%琼脂胰蛋白胨大豆 HiVeg 肉汤) 该培养基用于导管、血液和其他临床标本的厌氧菌培养。该培养基含有0.1%琼脂、酪蛋白水解物和消化大豆粉。

271. 专用加血浸出液肉汤 该培养基用于培养血培养中病原性球菌和其他致病性苛养菌,以及病原菌的同源性调查。该培养基包含动物组织浸出液、蛋白胨、葡萄糖和血液。

272. 标本保存培养基 该培养基用于粪便标本中微生物的保存和转运。该培养基包含甘油、柠檬酸、酵母提取物和脱氧胆酸盐。

273. 标准液体培养基 10B(Shepard's M10 培养基) 该培养基用于临床标本中解脲脲原体的分离培养。培养基含有许多生长因子,包括血清、酵母提取物、葡萄糖、氨基酸、NAD、维生素和血清。还包含牛心浸出液、蛋白胨和酚红。培养基中加入青霉素作为抑制剂。

274. 110 号葡萄球菌琼脂 该培养基用于临床标本中葡萄球菌的选择性分离。培养基中含有明胶、甘露醇、消化酪蛋白、酵母提取物和乳糖。

275. 葡萄球菌-链球菌选择性培养基 该培

养基用于临床标本中金黄色葡萄球菌和链球菌的选择性分离。培养基含有蛋白胨、淀粉和血液。还含有萘啶酸、硫酸黏菌素为抑制剂。

276. B群链球菌胡萝卜肉汤 这是一种用于检测孕妇中B群链球菌(GBS)感染的专用肉汤。该培养基中含有蛋白胨、淀粉、吗啉丙磺酸、葡萄糖、丙酮酸盐、生长因子和抑制剂。这是一种改良的Granada培养基,是一步法筛查孕妇是否存在GBS的培养基。典型的B群链球菌,试管显示为橙色到红色的颜色变化。试管显示橙色、红色或砖红色色素是溶血性B群链球菌独特的特征,那是因为与淀粉、蛋白胨、血清和叶酸抑制剂等底物反应所致。Church等报道称,与Lim肉汤相比,B组链球菌胡萝卜肉汤效果更好,而且降低了工作量[41]。

277. 链球菌选择培养基 该培养基用于临床标本中链球菌的选择性分离。培养基中含有蛋白胨、淀粉和血液。还含有硫酸黏菌素和奥索利酸作为抑制剂。

278. 链霉素琼脂 此培养基用于选择性分离、培养和计数含有混合菌的临床标本中的链球菌。该培养基包含消化酪蛋白、葡萄糖、消化大豆粉、柠檬酸钠、胱氨酸、叠氮钠、亚硫酸钠和结晶紫。

279. 改良Stuart转运培养基 该培养基用于奈瑟菌属和其他苛养菌从临床转运到实验室过程中的保存。该培养基含有甘油磷酸钠、半胱氨酸、巯基乙酸钠和亚甲蓝。

280. 蔗糖-仲烷基硫酸钠-亚碲酸盐琼脂(STT琼脂) 该培养基根据细菌发酵蔗糖的能力来选择性分离和鉴别弧菌属。培养基中含有牛肉提取物、蛋白胨、蔗糖、仲烷基硫酸钠、亚碲酸盐和溴酚蓝。霍乱弧菌呈现扁平的黄色菌落,副溶血性弧菌呈现凸起、黄绿色的湿润菌落。

281. 硫化物-吲哚-动力培养基 该培养基根据是否产生硫化氢、生成吲哚及是否有动力来鉴别肠杆菌科成员。培养基含有蛋白胨、牛肉提取物、蛋白胨化铁和硫代硫酸钠。

282. 超级多黏菌素培养基 该培养基用于筛选耐黏菌素的革兰阴性细菌[42],也是一种筛选耐黏菌素的革兰阴性分离株的普通培养基。培养基含有伊红亚甲蓝琼脂培养基成分及黏菌素、达托霉素、两性霉素B。

283. 连四硫酸盐肉汤,Hajna 该培养基用于粪便及尿标本中除伤寒沙门菌和亚利桑那沙门菌亚种之外的沙门菌属的分离。该培养基含有硫代硫酸盐、蛋白胨、甘露醇、酵母提取物、葡萄糖、脱氧胆酸钠、亮绿和碘。

284. 四氮唑耐受琼脂 该培养基是根据四氮唑耐受和生长能力来鉴别细菌的培养基。培养基含有消化酪蛋白和大豆粉及氯化三苯四唑。粪肠球菌能迅速还原四氮唑。

285. Thayer-Martin培养基 该培养基用于分离和培养苛养菌,特别是奈瑟菌属。该培养基含有蛋白胨淀粉、血红蛋白和复合氨基酸、葡萄糖、核苷酸、铁和维生素。

286. 改良Thayer-Martin培养基 该培养基用于分离和培养苛养菌,特别是奈瑟菌属。培养基含有蛋白胨淀粉、血红蛋白、复合氨基酸、葡萄糖、核苷酸、铁和维生素。葡萄糖和琼脂浓度低于原来配方的浓度,从而改善细菌生长。该培养基中也含有甲氧苄啶。

287. 巯基乙酸胆汁肉汤 该培养基用于临床标本中脆弱拟杆菌和产气荚膜梭菌的培养。培养基含有消化酪蛋白、葡萄糖、酵母提取物、胱氨酸、巯基乙酸钠和胆汁。

288. 巯基乙酸盐增菌培养基(含维生素K_1和氯化血红素巯基乙酸盐培养基,厌氧菌巯基乙酸盐培养基) 该培养基用于分离、培养和鉴定各种专性厌氧菌。该培养基包含消化酪蛋白、葡萄糖、酵母提取物、胱氨酸、巯基乙酸钠、胆汁、氯化血红素和维生素K_1。

289. 硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(TCBS琼脂) 该培养基用于各种临床标本中的霍乱弧菌和副溶血性弧菌的选择性分离。培养基含有蔗糖、柠檬酸盐、硫代硫酸盐、酵母提取物、消化酪蛋白、动物组织、牛胆(汁)、脱氧胆酸钠、柠檬酸铁、百里酚蓝和溴百里酚蓝。

290. Tinsdale琼脂 该培养基用于白喉棒杆菌初步分离和鉴定。培养基中含有蛋白胨、酵母提取物、胱氨酸、亚硫酸钠和亚碲酸钾。

291. Todd-Hewitt肉汤 该培养基用于A组链球菌的血清学分型和各种病原微生物的培养。培养基含有牛心浸出液、蛋白胨和葡萄糖。庆大霉素和萘啶酸可以加入培养基中作为选择性因素。

292. Stuart 转运培养基 该培养基用于含有各种微生物拭子样品转运中的保存，包括淋病奈瑟菌。该培养基含有甘油磷酸钠、巯基乙酸钠和亚甲蓝。

293. 胰蛋白酶大豆琼脂(胰蛋白酶大豆琼脂，soybean-casein 消化培养基) 该培养基通常是大多数细菌的基础培养基，当添加补充物后可以培养苛养菌。培养基含有消化酪蛋白和大豆粉。用于补充葡萄糖、各种氨基酸(如谷氨酰胺)和维生素；也可补充各种抗菌药物作为抑制剂；当补充羊血时，该培养基是用于观察各种细菌的溶血反应。

294. 含绵羊血和庆大霉素的胰蛋白酶大豆琼脂(含绵羊血和庆大霉素的 TSA Ⅱ) 该培养基用于各种临床标本中肺炎链球菌的分离。培养基含有消化酪蛋白、大豆粉、生长因子、血和庆大霉素。

295. 含绵羊血和万古霉素的胰蛋白酶大豆琼脂 该培养基用于各种临床标本中万古霉素耐药肠球菌(VRE)的分离。培养基中含有消化酪蛋白、大豆粉、血液和万古霉素。

296. 含绵羊血、蔗糖和四环素的胰蛋白酶大豆琼脂 该培养基用于各种临床标本中肺炎链球菌的分离。培养基含有消化酪蛋白、大豆粉、生长因子、蔗糖、血和四环素。

297. 胰蛋白酶亚碲酸盐基础琼脂 该培养基用于选择性分离来自临床标本的微生物，特别是来自鼻、咽喉和阴道的标本。培养基中含有消化酪蛋白、大豆粉、血液、葡萄糖、血清和亚碲酸盐。

298. 胰蛋白酶大豆血琼脂(胰蛋白酶血琼脂，TSA 血琼脂) 该培养基用于培养各种苛养菌并观察各种细菌的溶血反应。它可用于 CAMP 试验假设性鉴定 B 群链球菌(无乳链球菌)。培养基中含有消化酪蛋白、大豆粉及血液。

299. U9B 肉汤 该培养基用于分离和鉴定临床标本中的支原体 T 株，特别是解脲脲原体，T-支原体是支原体组中已知含有脲酶的成员。有脲酶活性的细菌使培养基变为深粉红色。该培养基包含消化酪蛋白、大豆粉、葡萄糖、半胱氨酸、青霉素、酚红和尿素。

300. 尿素琼脂(脲酶试验琼脂，尿素基础琼脂，Christensen) 该培养基利用脲酶活性快速检测变形杆菌和肠杆菌科的其他成员。脲酶阳性菌培养基变成粉红色。培养基中含有尿素、蛋白胨、葡萄糖和酚红。

301. 泌尿生殖道支原体肉汤培养基 该培养基是人型支原体与解脲脲原体的选择性培养基。培养基中含有心浸出液、酪蛋白、酵母提取物、精氨酸、半胱氨酸、酚红、血清、维生素和尿素。还含有青霉素和两性霉素 B 作为抑制剂。

302. 尿路感染显色琼脂(UTIC 琼脂) 该培养基用于假设性检测和鉴别引起尿路感染的细菌。

303. UVM(佛蒙特大学)改良李斯特菌增菌肉汤 该培养基是李斯特菌的选择性培养基。该培养基含有 2%NaCl、消化酪蛋白和动物组织、牛肉提取物、酵母提取物、七叶苷、萘啶酸和吖啶黄。

304. V 琼脂 该培养基用于分离和鉴别来自临床标本中的阴道加德纳菌。培养基含有消化酪蛋白、动物组织、蛋白胨、牛肉提取物、酵母提取物、淀粉和血。培养基平板放在含有 3%～10% CO_2 的环境中。阴道加德纳菌出现白色的弥漫 β-溶血的小菌落。

305. VACC 琼脂(Remel VACC 琼脂) 该培养基用于初步分离、选择和鉴别产 ESBL 的肠杆菌科细菌。

306. Vogel 和 Johnson 琼脂 该培养基用于检测凝固酶阳性的金黄色葡萄球菌。该培养基包含消化酪蛋白、甘露醇、甘氨酸、酵母提取物、氯化锂、酚红和亚碲酸盐。

307. 副溶血性弧菌琼脂(VP 琼脂) 该培养基用于分离、培养、计数和假设性鉴定副溶血性弧菌。发酵蔗糖的细菌显示为浅黄色边缘的黄色菌落。不发酵蔗糖的细菌出现黏液状、带有深绿色中心的绿色菌落。培养基含有蔗糖、柠檬酸盐、硫代硫酸盐、蛋白胨、牛磺胆酸钠、酵母提取物、十二烷基硫酸钠、溴百里酚蓝和百里酚蓝。

308. 副溶血性弧菌蔗糖琼脂 该培养基用于分离、培养和鉴别副溶血性弧菌。副溶血性弧菌和创伤弧菌呈现蓝绿色菌落。其他弧菌属呈现黄色菌落(蔗糖阳性)。这种培养基含有蔗糖、酵母提取物、胰蛋白、消化酪蛋白、胆盐和溴百里酚蓝。

309. 耐万古霉素肠球菌琼脂 该培养基用于临床标本中万古霉素耐药肠球菌和高水平氨基糖苷类耐药肠球菌的分离。含有 *VanC* 基因和不耐药的肠球菌在该培养基上不能生长。培养基含有胰蛋白胨、酵母提取物、柠檬酸盐、七叶苷、柠檬酸铁铵、叠氮钠，以及选择性补充的美罗培南和万古

霉素。选择性补充剂抑制革兰阴性菌和鹑鸡肠球菌的生长。该培养基含有指示剂来检测水解七叶苷的细菌的生长。肠球菌菌落由于亚铁离子和七叶苷水解产物衍生的酚类化合物的结合而产生黑色区域环绕菌落。

310. 耐万古霉素肠球菌选择培养基　这是一种针对粪便和肛拭子临床标本中耐万古霉素屎肠球菌和粪肠球菌的选择性鉴别培养基。

311. Wallenstein 培养基　该培养基用于分离分枝杆菌属中的除麻风分枝杆菌外的细菌。培养基中含有卵黄、甘油和孔雀石绿。

312. Wilkins-Chalgren 厌氧菌肉汤(厌氧菌肉汤,MIC)　该培养基用于厌氧菌的培养和抗菌药物敏感性(MIC)试验。该培养基含有消化酪蛋白、明胶蛋白胨、酵母提取物、葡萄糖、精氨酸、丙酮酸钠、氯化血红素和甲萘醌。

313. 木糖-赖氨酸-脱氧胆酸琼脂　该培养基用于分离和鉴别肠道致病菌,特别是志贺菌和普鲁威登菌。培养基含有乳糖、蔗糖、巯基乙酸、赖氨酸、木糖、脱氧胆酸钠、柠檬酸铁铵和酚红。细菌不发酵木糖、乳糖或蔗糖呈现为红色菌落;发酵木糖、赖氨酸脱羧阳性的细菌,出现红色菌落,发酵木糖、赖氨酸脱羧阴性的细菌显示为不透明的黄色菌落;发酵乳糖或蔗糖的细菌显示为黄色的菌落。

314. 木糖-乳糖-表面活性剂 4 培养基　该培养基用于分离和鉴定临床标本中的沙门菌。培养基含有乳糖、蔗糖、巯基乙酸、赖氨酸、木糖、酵母提取物、蛋白胨、酚红和含有表面活性剂 4 的选择性补充物。在选择剂存在下,培养基中表面活性剂 4 能抑制许多在其他平皿上疑似的微生物。此外,培养基内部生化特性及 pH 改变有助于沙门菌(黑色菌落)与其他细菌的鉴别,如大肠埃希菌(黄色菌落)和志贺菌属(红色菌落)。该培养基增强了选择性,减少了进一步鉴定的程序,节省时间和金钱,并且假阳性菌落少于其他沙门菌平皿培养结果。

315. 木糖脱氧胆酸钠柠檬酸琼脂　该培养基用于沙门菌属和某些志贺菌的培养。培养基中含有木糖、柠檬酸盐、硫代硫酸钠、牛肉提取物、蛋白胨、柠檬酸铁铵、脱氧胆酸盐和中性红。

316. 耶尔森菌选择性培养基　该培养基用于分离和计数临床标本中的耶尔森菌。该培养基包含甘露醇、蛋白胨、酵母提取物、丙酮酸钠、脱氧胆酸盐、中性红和结晶紫。还包含头孢磺啶、氯苯酚、新生霉素和选择因子。

附录

培养基添加剂

许多培养基包含具有选择、鉴别、保护某些细菌菌种的特别功能的添加剂。下面是一些常用培养基添加剂的介绍。

吖啶黄:选择剂,抑制革兰阳性菌。

ADC 营养液:补充添加到分枝杆菌培养基中。包括白蛋白、葡萄糖、触酶和氯化钠;培养基中触酶可分解过氧化物。

加 0.05%~0.10%琼脂的肉汤培养基:用于减少氧气张力。

白蛋白:对培养基中产生的有毒产物起保护作用,结合游离脂肪酸。

抗菌药物:添加一种或多种抗菌药物,使培养基具有选择性,抑制能力取决于使用抗菌药物的浓度。

碳酸氢盐柠檬酸颗粒:用于在封闭的环境中遇潮后产生 CO_2 气体,常用在分离淋病奈瑟菌时的运输装置中。

亚硫酸铋:重金属,是共生菌的抑制剂。

碳水化合物:能量来源,与指示剂一起使用制备鉴别培养基。

十六烷基三甲基溴化铵:作为季铵阳离子去污剂能使氮和磷从除铜绿假单胞菌之外的细菌中释放。

木炭:解毒剂,表面张力调节剂,自由基和过氧化物的清除剂。

玉米淀粉:充当解毒剂,并可以提供额外的营养素作为能量来源。

Dent 补充剂(Oxoid 公司):万古霉素、甲氧苄啶、头孢磺啶和两性霉素 B 加入哥伦比亚血琼脂和马血溶解培养基并分离幽门螺杆菌。

葡萄糖:使培养基高渗,能量来源。

卵黄:用来证明卵磷脂酶、脂肪酶、蛋白水解活性和脂肪酸的试剂。

柠檬酸铁铵:与其他(七叶苷和硫代硫酸钠)试剂联合使用的铁盐,目的是通过产生黑色沉淀而鉴别细菌。

Fildes 营养液：提供营养来源丰富的羊血胃蛋白酶消化液，其中包括 X（氯化血红素）和 V（NAD）因子；X 因子原来认为是“未知的”，V 最初被认为是“维生素”。

甘油：纯化酒精和丰富的碳源，用于培养、运输、储存培养基和准备试剂。

甘氨酸：选择剂，生物的抑制剂。

马血清：用于生长培养基中的营养剂。如支原体和解脲脲原体的培养基。

IsoVitaleX(BBL)：提供 V 因子（NAD）和额外的营养成分，如维生素、氨基酸、三价铁离子和葡萄糖，促进苛养菌的生长。

溶解的绵羊血和溶解的马血：通过冻融方法制备，增强厌氧菌产生色素，用于苛养菌的药物敏感性试验。

氯化锂：选择剂，可抑制微生物。

孔雀石绿：一种染料，可部分抑制细菌。

ACES：不抑制细菌，与其他无机盐缓冲液一起提供最适 pH 缓冲作用。

NAD（V 因子）：一些苛养菌生长的必要的物质。

OADC 富集营养液：补充添加到分枝杆菌培养基中，包括油酸、白蛋白、右旋糖、触酶和氯化钠，油酸提供了分枝杆菌需要的脂肪酸，触酶在培养基中分解过氧化物。

牛胆（汁）：抑制特异的微生物，提供培养基的选择性。

蛋白胨：无糖源的营养物。

苯乙醇：可逆性抑制 DNA 合成，抑制兼性厌氧的革兰阴性菌。

磷酸吡哆醛：添加到分离苛养菌培养基的补充液中，还用于“卫星试验”纸片的制备。

兔血：增强厌氧菌色素的产生；确定链球菌“真正的”溶血反应；添加心浸出液琼脂用于巴尔通体属分离。

血清：白蛋白，脂肪酸

羊血液和人血液：提供血红素和其他营养物质，使链球菌出现真正的溶血反应，羊血中 NADase 酶灭活 NAD，故羊血中无可利用的 NAD。

琼脂基础（Skirrow）的补充物：万古霉素、甲氧苄啶和多黏菌素 B 加入哥伦比亚琼脂和马血红素培养基中，用于分离幽门螺杆菌。

叠氮钠：抑制革兰阴性菌的选择性制剂。

碳酸氢钠：中和剂，用于中和胃洗液或灌洗标本，以获得微生物。

亚硫酸氢钠：消毒剂，抗氧化剂或还原剂。

氯化钠：维持渗透压平衡，当加入高浓度的时候，能选择性抑制微生物。

柠檬酸钠：选择性抑制微生物。

脱氧胆酸钠：胆汁酸盐和一种选择性抑制剂，抑制革兰阳性菌和芽胞形成。

聚茴香磺酸钠：多聚阴离子抗凝剂，灭活氨基糖苷类抗菌药物，干扰血液中的补体级联反应、溶菌酶活性和吞噬活性。可能会抑制奈瑟菌、加德纳菌、链杆菌、消化链球菌、弗朗西丝菌和莫拉菌属。

丙酮酸钠：促生长剂。

亚硒酸钠：选择性抑制剂，抑制大肠菌群。

巯基乙酸钠：还原剂。

淀粉：多醣和解毒剂，混合到一些培养基中作为鉴别剂。

亚碲酸盐：对无芽胞菌株有毒，生长的菌落呈黑色。

吐温-80（聚山梨醇酯 80）：一种油酸酯，能促进生长，并提供脂肪酸作为分散剂。

维生素 K：某些专性厌氧菌的最佳生长必需成分，如拟杆菌群。

Vitox（Oxoid 公司）：提供 V 因子（NAD）和其他基本的生长因子，促进苛养菌的生长。见 IsoVitaleX。

酵母提取物：水溶性的，提供 B 族维生素和蛋白质。

本章包含手册第 9 版 Kimberle Chapin 和 Tsai-Ling Lauderdale 撰写的细菌学试剂和材料章节中的部分试剂。其中，表 20-1 和“培养基添加剂”直接选自该章节。部分染色和试剂的描述也基于该章节。

参考文献请扫二维码查阅

第3篇

革兰阳性球菌

第21章　需氧革兰阳性球菌鉴定的基本方法

JENS JØRGEN CHRISTENSEN, XIAOHUI CHEN NIELSEN, KATHRYN L. RUOFF

(张利军　译;许建成　审校)

从临床标本中分离出的主要需氧或兼性厌氧革兰阳性球菌分布在葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)和肠球菌属(*Enterococcus*)内。本群的分子生物学分类研究已经发现一些在表型上与常见种属相似但很少从临床标本中分离的种属。表 21-1、表 21-2 和本书第 22～25 章介绍的基础表型检测试验可将葡萄球菌、链球菌和肠球菌与这些罕见菌株区分开来。应当指出,表 21-1 和表 21-2 中所列的反应结果仅代表多数菌株,实际分离菌中可能遇到多变的反应结果。每个表内包括具有相似形态的细菌,例如,"链球菌"指革兰阳性球菌或球杆菌排列成对和(或)成链,"葡萄球菌"呈球形排列成对、四联状、成簇和不规则。根据菌体形态将这些细菌分成 2 组,并不意味着它们有分类学上的亲缘关系。常规分离的需氧革兰阳性球菌(葡萄球菌、链球菌和肠球菌)可以通过一些基础表型试验准确鉴定,如细胞形态、触酶试验(catalase reaction)、吡咯烷酮芳胺酶(pyrrolidonyl arylamidase, PYR)[1] 等(表 21-1 和表 21-2,以及第 22～25 章)。仅凭单个或少数几个表型检测判断可能导致误判。如奥普托欣耐药的肺炎链球菌[2] 可能误鉴定为 α-溶血性(草绿色)链球菌(第 23 章)。凝固酶阴性的路邓葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)其凝集因子(玻片凝固酶)阳性可能被误鉴定为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)[3](第 22 章)。PYR 阳性的乳球菌属(*Lactococcus*)可能被错误鉴定为肠球菌属成员[4](第 24 章)。

由于新的需氧革兰阳性球菌种属的发现,仅凭基础的表型试验越来越难以鉴定某些不常见的分离菌种。各种自动和手工鉴定系统已经可以相当准确地鉴定常见的葡萄球菌、链球菌和肠球菌菌种(第 22～25 章的"鉴定"部分)[5-7],但这些系统不能有效地鉴定少见的需氧革兰阳性球菌(第 25 章)。少见菌株用这些系统鉴定可能得不到确切的鉴定结果或误判为其他属或种。基础表型鉴定对于少见需氧革兰阳性球菌可给出推测性鉴定,但大量的表型试验、分子生物学方法及近年来使用的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry MALDI-TOF MS)对准确鉴定进行评估,这是有价值的,但并不是不可或缺的。包括数据库更新在内的 MALDI-TOF MS 方法学不断改进,对于上市商品系统,质谱作为革兰阳性球菌的一种主要常规鉴定方法已经非常有吸引力,在必要时可辅以表型试验。表 21-1 和表 21-2 列出了包括在布鲁克(Bruker)和生物梅里埃(bioMérieux)最近更新的体外诊断(IVD)数据库中的许多属和种。2 个系统都存在仅研究用(RUO)数据库。

一些检测常见的需氧革兰阳性球菌核酸探针和扩增方法已经商品化,并应用于中到大规模的临床微生物学实验室。在鉴定表型相似的少见菌株时,这些方法对于区分肠球菌、链球菌或葡萄球菌也很有用。尽管其他基因的序列比对也有助于鉴定,但临床有兴趣的需氧革兰阳性球菌的分子特征最有用的方法之一是 16S rRNA 基因序列分析比对[8]。目的基因检测包括葡萄球菌 *rpoB*、*tuf* 和 *sodA* 基因[9],链球菌 *rpoB* 基因[10],肠球菌 *atpA* 基因[11]。其他鉴定方法如肠球菌的多位点序列分析(*rpoA* 和 *pheS* 基因)[12] 和针对 *sodA* 基因和 16S～23S rRNA 基因区间特定片段的熔解曲线分析(melting-curve analysis)(肠球菌和类似非溶血性链球菌的属和种)[13-14] 也有报道。不同菌种的全基因组测序菌株数量的增加,以及二代测序技术(NGS)的可用性不断提高,将使鉴定和菌株比对在未来越来越准确。

表 21-1 需氧环境生长的成对和链状排列触酶阴性革兰阳性球菌在 2 种 MALDI-TOF MS 数据库中的特征及分类可用性[a]

PYR	LAP	6.5% NaCl	BE	动力	45℃	探针	HIP	卫星现象	10℃	万古霉素耐药	微生物(章节)	MALDI-TOF MS，布鲁克/生物梅里埃[b]
+	+	+	+	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	肠球菌属(第 24 章)	34/11
+	+	+	+	+	−	NA	NA	NA	NA	NA	漫游球菌属(*Vagococcus*)(第 25 章)	2/1
+	+	+	+	−	NA	+	NA	NA	NA	NA	肠球菌属(第 24 章)	34/11
+	+	+	+	−	NA	−	NA	NA	NA	NA	乳球菌属(第 25 章)	5/5
+	+	+	−	NA	NA	NA	+	−	NA	NA	费克蓝姆菌属(*Facklamia* spp.)[c](第 25 章)	2/2
+	+	+	−	NA	NA	NA	−	V	NA	NA	懒惰菌属(*Ignavigranum*)(第 25 章)	0/0
+	+	−	+	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	漫游球菌属(第 25 章)	2/1
+	+	−	+	−	NA	NA	NA	NA	NA	NA	乳球菌属(第 25 章)	5/5
+	+	−	−	NA	NA	NA	NA	+	NA	NA	乏养菌属(*Abiotrophia*)	1/1
											颗粒链菌属(*Granulicatella*)(第 25 章)	3/2
+	+	−	−	NA	NA	NA	NA	−	NA	NA	孪生球菌属(*Gemella* spp.)[d](第 25 章)	5/4
+	−	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	血圆短链菌(*Globicatella sanguinis*)(第 25 章)	1/1
+	−	−	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	狡诈球菌属(*Dolosicoccus*)(第 25 章)	0/0
−	+	−	NA	−	NA	NA	+	NA	NA	−	不解糖孪生球菌(*Gemella asaccharolytica*)[e](第 25 章)	0/0
−	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	NA	乳球菌属(第 25 章)	5/3
−	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	−	NA	链球菌属[f](第 23 章)	68/40
−	−	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	+	明串珠菌属(*Leuconostoc*)[g](第 25 章)	9/4
−	−	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	−	产硫化物圆短链菌(*Globicatella sulfidifaciens*)(第 25 章)	1/1

注：[a] 在第 20 章和第 23～25 章中该表提及的用于鉴定的方法反应是典型的，但也有例外。PYR. 吡咯烷酮芳胺酶；LAP. 亮氨酸氨基肽酶；6.5% NaCl：在 6.5% NaCl 条件下生长；BE. 40% 胆汁七叶苷水解试验；45℃：45℃生长；探针(probe)：与市售的肠球菌属核酸探针反应；HIP. 马尿酸水解试验；卫星现象(Satellitism)：卫星生长现象；10℃：10℃生长；+：大部分菌株是阳性；−. 大部分菌株是阴性；V. 反应不定；NA. 不适用。[b] 布鲁克(MBT_IVD_Library_DB-7171)和生物梅里埃(VITEK_MS_Clinical_Use_-_V3.0_Knowledge_Base)的体外诊断(IVD)数据库中包括的属和种的数目。2 个数据库都有仅用于研究(RUO)的数据库。[c] 人费克蓝姆菌(*Facklamia hominis*)、稍氏费克蓝姆菌(*F. sourekii*)和懒惰费克蓝姆菌(*F. ignava*)在列表中列出的反应是典型的。惰性费克蓝姆菌(*F. languida*)成簇排列，而且马尿酸水解试验阴性(表 21-2)。[d] 不解糖孪生球菌、伯杰孪生球菌(*G. bergeri*)、麻疹孪生球菌(*G. morbillorum*)和血孪生球菌(*G. sanguinis*)通常成对和链状排列，相反，溶血孪生球菌(*G. haemolysans*)成对、四联和成簇排列(表 21-2)。[e] 不解糖孪生球菌革兰染色可变(第 25 章)。[f] 大部分链球菌 PYR 试验阴性，但化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)和某些肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)PYR 试验阳性。[g] 明串珠菌属与此处其他触酶阴性球菌的区别在于其能分解葡萄糖产气及对万古霉素天然耐药。表型相似的魏斯菌属(*Weissella*)包括之前被分类为明串珠菌属的菌种和旧称为混淆乳杆菌(*Lactobacillus confusus*)的菌种(第 25 章)

表 21-2　需氧环境生长的成簇或不规则排列革兰阳性球菌在 2 种 MALDI-TOF MS 数据库中的特征及分类可用性[a]

触酶	专性需氧	氧化酶	PYR	LAP	NaCl	ESC	溶血	万古霉素	BGUR	微生物(章节)	MALDI-TOF MS,布鲁克/生物梅里埃[b]
+	+	+	NA	NA	+[c]	NA	NA	NA	NA	微球菌属(*Micrococcus*)[d](第 22 章)	4/3
+	+	—	NA	NA	+[e]	NA	NA	NA	NA	差异球菌属(*Alloiococcus*)(第 22 章)	1/1
+	—	—	NA	NA	+[c]	NA	NA	NA	NA	葡萄球菌属(第 22 章)	41/34
+	—	—	NA	NA	—[c]	NA	NA	NA	NA	黏滑罗氏菌(*Rothia mucilaginosa*)[f](第 29 章)	1/1
—	—	NA	+	+	+[e]	+	NA	NA	—	狡诈菌属(第 25 章)	1/1
—	—	NA	+	+	+[e]	+	NA	NA	+	栖血气球菌(*Aerococcus sanguinicola*)(第 25 章)	1/0
—	—	NA	+	+	+[e]	—	NA	NA	—	惰性费克蓝姆菌[g](第 25 章)	1/0
—	—	NA	+	+	—[e]	+	NA	NA	NA	黏滑罗氏菌[f](第 29 章)	1/1
—	—	NA	+	+	—[e]	—	NA	NA	NA	溶血孪生球菌[h](第 25 章)	1/1
—	—	NA	+	—	NA	NA	α	NA	NA	浅绿色气球菌(*Aerococcus viridans*)[i](第 25 章)	1/1
—	—	NA	+	—	NA	NA	γ	NA	NA	孔兹创伤球菌(*Helcococcus kunzii*)[i](第 25 章)	1/1
—	—	NA	—	+	NA	NA	NA	R	NA	片球菌属(*Pediococcus*)[j](第 25 章)	8/5
—	—	NA	—	+	NA	NA	NA	S	+	尿气球菌(*Aerococcus urinae*)(第 25 章)	1/1
—	—	NA	—	—	NA	NA	NA	NA	+	人尿气球菌(*Aerococcus urinaehominis*)(第 25 章)	1/0
—	—	NA	—	—	NA	NA	NA	NA	—	柯氏气球菌(*Aerococcus christensenii*)(第 25 章)	1/0

注:[a] 在第 20 章、第 22 章、第 25 章和第 29 章中该表提及的用于鉴定的方法反应是典型的,但也有例外。PYR. 吡咯烷酮芳胺酶;LAP. 亮氨酸氨基肽酶;NaCl. 在 5%或 6.5%NaCl 条件下生长(见脚注 c 和 e);ESC. 七叶苷水解试验;BGUR. β-葡萄糖苷酸酶;+. 大部分菌株是阳性;—. 大部分菌株是阴性;V. 反应不定;NA. 不适用。α. 羊血平板上为 α 溶血;γ. 羊血平板上没有溶血;S. 敏感;R. 耐药。[b] 布鲁克(MBT_IVD_Library_DB-7171)和生物梅里埃(VITEK_MS_Clinical_Use_-_V3.0_Knowledge_Base)的体外诊断(IVD)数据库中包括的属和种的数目。2 个数据库都有仅用于研究(RUO)的数据库。[c] 在 5%NaCl 条件下生长。[d] 在临床标本中较少分离出的库克菌属(*Kocuria*)与微球菌属的区别在于库克菌属可以进行 D-葡萄糖和甘油的需氧产酸(第 22 章)。(译者注:此处与第 22 章对应处矛盾,应该是甘油需氧产酸而 D-葡萄糖厌氧产酸)。[e] 在 6.5%NaCl 条件下生长。[f] 黏滑罗氏菌通常触酶阴性或弱阳性,但也有可能是强阳性。气罗氏菌(*Rothia aeria*)和龋齿罗氏菌(*Rothia dentocariosa*)通常是触酶阳性。[g] *Ignavigranum ruoffiae*(表 21-1)与惰性费克蓝姆菌在 PYR、ESC 和 NaCl 试验的反应完全一致。但是,*I. ruoffiae* 细胞主要排列成链,而惰性费克蓝姆菌细胞通常成簇排列,其他费克蓝姆菌菌株细胞成对或成链排列(表 21-1)。[h] 溶血孪生球菌倾向于成对、四联和成簇排列,但其他孪生球菌通常成对或短链状(表 21-1)。另外 2 种孪生球菌,副溶血孪生球菌(*Gemella parahaemolysans*)和台湾孪生球菌(*Gemella taiwanensis*)与溶血孪生球菌类似。详细内容见第 25 章。[i] 35℃需氧培养 24 h 后孔兹创伤球菌在血琼脂平板上可形成细小针尖状不溶血的菌落,而浅绿色气球菌在相同条件下则形成具有 α 溶血的较大菌落。与孔兹创伤球菌相反,浅绿色气球菌在需氧环境孵育时生长得更好。从人体新分离 2 种创伤球菌,每种菌都是基于单一的分离株报道。与孔兹创伤球菌不同,新发现的瑞典创伤球菌(*Helcococcus sueciensis*)和提议命名的"化脓创伤球菌(*Helcococcus pyogenes*)"PYR 阴性(第 25 章)。[j] 除了四联球菌对万古霉素敏感外,片球菌属(*Pediococcus*)和四联球菌属(*Tetragenococcus*)具有相似的表型特征。胆汁七叶苷试验可以区分四联球菌(阳性)和尿气球菌(阴性)(第 25 章)

MALDI-TOF MS 越来越多地用于常规菌株鉴定，由于不断地发展和改进，其用途正在不断扩大[15]。市售的 MS 仪器和数据库有许多共同的优势。虽然数据库各有优缺点，但仍在持续改进中。比较 MALDI-TOF MS 和其他方法，无论是表型还是基因型比对的结果都是非常令人鼓舞的。一般情况下，对于肠球菌、链球菌、葡萄球菌和其他除链球菌或肠球菌外触酶阴性革兰阳性球菌，即使是现有 MALDI-TOF MS 数据库和软件包括的一些很难区分的菌株，均可获得相当可靠的鉴定结果[16-23]。利用质谱技术对可能涉及暴发的菌株进行分型[例如，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *S. aureus*)、金黄色葡萄球菌和耐万古霉素肠球菌(vancomycin-resistant enterococci)]是目前积极研究的领域，但是这也取决于软件的开发情况[24-25]。更多关于该群细菌的分子生物学鉴定方法见本书第 22～25 章。

每个微生物学实验室都需要对需氧革兰阳性球菌常规鉴定流程建立标准化操作规程。应尽力鉴定和报告不同来源临床标本中的病原体或已知药敏模式的病原菌，因为在这些病例中鉴定可能对指导患者治疗发挥重要作用。例如，有时分离的所有葡萄球菌应该用自动鉴定系统鉴定到种的水平，在一些情况下，葡萄球菌也可以仅做凝固酶试验鉴定是否为金黄色葡萄球菌，而凝固酶阴性葡萄球菌可以通过几个简单的筛选试验，推定其为腐生葡萄球菌或路邓葡萄球菌。如在混合培养中出现的细菌鉴定为"草绿色链球菌"可能就足够了，但一些重要部位的分离株鉴定到种可以给临床提供相关信息[如心内膜炎病例中的"牛链球菌群"，脑或肝脓肿病例中的"咽峡炎链球菌群"("米勒链球菌"群)]。鉴定流程可以反映实验室的资源、工作流程、实验室所服务的患者群体组成和作为实验室用户的临床对检验结果的应用情况。

参考文献请扫二维码查阅

第22章　葡萄球菌、微球菌及其他触酶阳性球菌

KARSTEN BECKER, ROBERT L. SKOV, CHRISTOF von EIFF

（张利军　译；许建成　审校）

一、分类

以往将葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、微球菌属（*Micrococcus*）、口腔球菌属（*Stomatococcus*）和动性球菌属（*Planococcus*）同归属于微球菌科（*Micrococcaceae*），包括触酶阳性的革兰阳性球菌。但是分子系统发生学（molecular phylogenetic）和化学分类分析（chemotaxonomic analyses）均表明，葡萄球菌和微球菌并无明确关系，而是属于不同的菌门（phyla），分别是硬壁菌门（*Firmicutes*）和放线菌门（*Actinobacteria*）。在《伯杰细菌和古菌系统学手册》（*Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*）（更新至2017年10月3日）[1]的分类学大纲中，将葡萄球菌属和多种其他菌属（表22-1）归入葡萄球菌科。目前葡萄球菌科与芽胞杆菌科（*Bacillaceae*）、动性球菌科（*Planococcaceae*）、李斯特菌科（*Listeriaceae*）和其他菌科同属于芽胞杆菌目（the order *Bacillales*）。

表22-1　葡萄球菌科的分类（硬壁菌门，芽胞杆菌纲，芽胞杆菌目）

属[a]	注释[b]
Abyssicoccus Jiang 等，2016	1个菌种（没有临床意义）
Aliicoccus Amoozegar 等，2014	1个菌种（没有临床意义）
Auricoccus Prakash 等，2017	1个菌种（从人耳皮肤分离）
Corticicoccus Li 等，2017	1个菌种（没有临床意义）
酱球菌属 Yoon 等，2003	10个菌种（没有临床意义）
巨型球菌属 Kloos 等，1998	8个菌种，包括解酪巨型球菌，即之前的解酪葡萄球菌（对人类没有临床意义，在动物的感染中有少数报道，详见正文）
医院球菌属 Morais 等，2008	2个菌种（临床意义不确定，可能与人类微生物群有关，详见正文）
盐水球菌属 Ventosa 等，1990	16个菌种（没有临床意义）
葡萄球菌属 Rosenbach，1884	46个菌种，包括21个亚种（详见正文）
以前的成员 孪生球菌属 Berger，1960	9个菌种，转移到芽胞杆菌科Ⅺ；地位未定

注：[a]根据《伯杰细菌和古菌系统学手册》（更新至2016年5月8日）和系统命名法原核生物名称列表（http://www.bacterio.net/）；[b]截至2018年1月

微球菌属细菌基本无变化，仅有个别以前归为微球菌属的细菌被划归到新设立的库克菌属（*Kocuria*）、涅斯捷连科菌属（*Nesterenkonia*）、皮肤球菌属（*Kytococcus*）和皮生球菌属（*Dermacoccus*）。将这些菌属重新分入2个科：重新定义的微球菌科和新命名的皮生球菌科（Dermacoccaceae）。它们均是高G+C含量的革兰阳性球菌。2个科都归于放线菌纲（the class Actinobacteria）的微球菌目（the order Micrococcales）[（微球菌亚目（suborder Micrococcineae）][2]。同时，微球菌科包括越来越多的属，但它们在很大程度上没有临床意义（表22-2）。此前口腔球菌属唯一成员黏滑口腔球菌（*Stomatococcus*

mucilaginosus)被重新分类到黏滑罗氏菌。皮生球菌科包括模式菌皮生球菌属及除了皮肤球菌属菌种之外再无重要医学价值的菌属(表 22-2)。

表 22-2 微球菌科及相关类群的分类(放线菌门、放线菌纲、微球菌目、微球菌亚目)

微生物[a]	之前的定位或名称	注释[b]
皮生球菌科		
Allobranchiibius Ai 等,2017		1 个菌种(没有临床意义)
Barrientosiimonas Lee 等,2013		3 个菌种(没有临床意义)
鱼鳃菌属 Sugimoto 等,2011		2 个菌种(没有临床意义)
温泉杆菌属 Ruckmani 等, 2011		2 个菌种(没有临床意义)
Demetria Groth 等, 1997		1 个菌种(没有临床意义)
皮生球菌属 Stackebrandt 等,1995	在某种程度上属于之前微球菌属的一部分(如西宫皮生球菌即之前的西宫微球菌)	4 个菌种[西宫微球菌(译者注:此处应为西宫皮生球菌)]偶尔从人类皮肤分离,*D. barathri* 有过导管相关的血流感染的报道,详见正文
弯形杆菌属 Anzai 等,2012		4 个菌种(没有临床意义)
皮肤球菌属 Stackebrandt 等,1995	在某种程度上属于之前微球菌属的一部分(如久坐皮肤球菌即之前的久坐微球菌)	3 个菌种(施勒特皮肤球菌和久坐皮肤球菌报告过与感染相关,详见正文)
黄粉尘菌属 Ara 等,2010		2 个菌种(没有临床意义)
Rudaeicoccus Kim 等,2013		1 个菌种(没有临床意义)
Yimella Tang 等,2010		2 个菌种(没有临床意义)
微球菌科		
伴螨菌属 Pukall 等,2006		1 个菌种(没有临床意义)
节杆菌属 Conn 和 Dimmick,1947	在某种程度上属于之前微球菌属的一部分(如敏捷节杆菌即之前的敏捷微球菌)	详见第 29 章
耳炎杆菌属 Yassin 等,2011		1 个菌种(临床意义尚不清楚,详见正文)
柠檬球菌属 Altenburger 等,2002		5 个菌种,提名了更多的菌种(没有临床意义)
Enteractinococcus Cao 等,2012	将 *Yaniella fodinae* 重新分类为 *E. fodinae*	2 个菌种,提名了更多的菌种(没有临床意义)
Garicola Lo 等,2015		1 个菌种(没有临床意义)
Glutamicibacter Busse,2016	将节杆菌属的 9 个菌种转入 *Glutamicibacter* 属	10 个菌种(详见第 29 章)
Haematomicrobium Schumann 和 Busse,2017	将血节杆菌重新分类至 *H. sanguinis*	1 个菌种(腹膜炎病例报告)
库克菌属 Stackebrandt 等,1995	在某种程度上属于之前微球菌属的一部分[c,d]	23 个菌种,提名了更多的菌种(*K. koreensis*、克氏库克菌、*K. marina*、"马赛库克菌"、玫瑰色库克菌、嗜根库克菌和变异库克菌已经报道与感染有关,详见正文)
Micrococcoides Tóth 等,2017		1 个菌种(没有临床意义)
微球菌属 Cohn,1872	1995 年重新分类[d]并将多个菌种转入新建立的菌属	9 个菌种(藤黄微球菌和里拉微球菌已经报道与感染有关,详见正文)
Neomicrococcus Prakash 等,2015	将 *Zhihengliuella aestuarii* 重新分类至 *N. aestuarii* 并将乳微球菌分类至 *N. lactis*	2 个菌种(没有临床意义)

（续　表）

微生物[a]	之前的定位或名称	注释[b]
涅斯捷连科菌属 Stackebrandt 等，1995	在某种程度上属于之前微球菌属的一部分[d]（盐生涅斯捷连科菌即以前的盐生微球菌）	16 个菌种（没有临床意义）
Paenarthrobacter Busse，2016	将节杆菌属的 6 个菌种转入 *Paenarthrobacter* 属	6 个菌种（详见第 29 章）
Paeniglutamicibacter Busse，2016	将节杆菌属的 6 个菌种转入 *Paeniglutamicibacter* 属	6 个菌种（详见第 29 章）
Pseudarthrobacter Busse，2016	将节杆菌属的 10 个菌种转入 *Pseudarthrobacter* 属	10 个菌种（详见第 29 章）
Pseudoglutamicibacter Busse，2016	将节杆菌属的 2 个菌种转入 *Pseudarthrobacter* 属（译者注：此处应为 *Pseudoglutamicibacter* 属）	2 个菌种（详见第 29 章）
Renibacterium Sanders and Fryer，1980		1 个菌种（没有临床意义，鱼类致病菌）
罗氏菌属 Georg and Brown，1967	将黏滑口腔球菌[e] 重新分类为黏滑罗氏菌	已有黏滑罗氏菌相关感染的报道，其他罗氏菌属的菌种见第 29 章
中华单胞菌属 Zhou 等，2009	将节杆菌属的 2 个菌种转入中华单胞菌属	9 个菌种（包括 *S. echigonensis*，不是有效发表；没有临床意义）
Tersicoccus Vaishampayan 等，2013		2 个菌种（没有临床意义）
Yaniella Li 等，2008		3 个菌种（没有临床意义）
Zhihengliuella Zhang 等，007（译者注：此处应为 2007）		5 个菌种（没有临床意义）

注：[a] 根据《伯杰细菌和古菌系统学手册》（更新至 2016 年 5 月 8 日）和系统命名法原核生物名称列表（http://www.bacterio.net/）。[b] 截至 2018 年 1 月。[c] 将原微球菌属成员转入库克菌属，例如，变异微球菌转为变异库克菌、克氏微球菌转为克氏库克菌、玫瑰色微球菌转为玫瑰色库克菌、变异微球菌转为变异库克菌（译者注：此处前后 2 次提及变异微球菌，应为原文笔误）。将变异库克菌 CCM132 重新分为嗜肉库克菌。将 *K. erythromyxa*，即以前的 *Deinococcus erythromyxa*（"*Sarcina erythromyxa*"）划为玫瑰色库克菌。[d] 参见 Stackebrandt 等对微球菌属的分类[7]。[e] 之前的微球菌科成员

耳炎差异球菌（*Alloiococcus otitis*）是差异球菌属唯一的菌种，它是从人体标本分离的与上述菌属无关的触酶阳性革兰阳性球菌。该菌属于芽胞杆菌纲（class Bacilli）乳杆菌目（order Lactobacillales）肉杆菌科（Carnobacteriaceae）。

进一步详细的分类[1]和参考文献请参见《伯杰细菌和古菌系统学手册》，也可登录 LPNS（the List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature）网站（http://www.bacterio.net）查询。

二、微生物特征

（一）葡萄球菌科

葡萄球菌是无动力、无芽胞革兰阳性球菌，直径 0.5～1.5 μm，呈单个、成对、四联或短链状排列，由于葡萄球菌在多个平面分裂，因此呈不规则簇状排列似葡萄串状。除解糖葡萄球菌（*Staphylococcus saccharolyticus*）［以前称解糖消化球菌（*Peptococcus saccharolyticus*）］和金黄色葡萄球菌厌氧亚种（*Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*）为厌氧菌外，大部分菌株为兼性厌氧（表 22-3）。尽管葡萄球菌通常触酶阳性，罕见的触酶阴性菌株也曾有报道。除弗氏葡萄球菌（*Staphylococcus fleurettii*）、缓慢葡萄球菌（*S. lentus*）、松鼠葡萄球菌（*S. sciuri*）、斯德潘罗夫葡萄球菌（*S. stepanovicii*）和小牛葡萄球菌（*S. vitulinus*）外，大多数葡萄球菌在改良的氧化酶试验中细胞色素氧化酶阴性。葡萄球菌可以在 18～40℃，含 10%NaCl 琼脂上生长。通过有氧呼吸和发酵获得能量。细胞壁中含肽聚糖和磷壁酸。葡萄球菌对溶葡萄球菌酶敏感。

表 22-3 葡萄球菌属与其他革兰阳性球菌鉴别[a]

菌属和例外的菌种	DNA G+C含量(mol%)	严格需氧	兼性厌氧或微需氧	严格厌氧	四联排列	紧黏琼脂	动力	生长试验 5% NaCl	生长试验 6.5% NaCl	生长试验 12% NaCl	生长试验 P琼脂18 h生长[b]	生长试验 Schleifer-Kramer琼脂[c]	触酶[d]	联苯胺试验[e]	氧化酶(改良法)[f]	葡萄糖厌氧产酸[g]	甘油需氧产酸	耐药 溶葡萄球菌酶(200 μg/ml)	耐药 红霉素(0.4 μg/ml)	耐药 杆菌肽(0.04 U)[h]	耐药 呋喃唑酮(100 μg)[i]
葡萄球菌属	30~39	−	d	−	d	−[j]	−	+	+	d	+	+	+	+	−	d	+	−	+	+	−
金黄色葡萄球菌厌氧亚种		−	±	±	−	−	−	+	+	d	−	ND	−	−	−	+	+	−	+	ND	−
解糖葡萄球菌		−	±	±	+	−	−	+	+	±	−	ND	−	±	−	+	+	−	+	ND	−
人葡萄球菌		±[k]	±	−	+	−	−	+	+	±	+	+	+	+	−	+	+	−	+	+	−
耳葡萄球菌		−	+	−	+	−	−	+	+	±	−	ND	+	+	−	+	+	−	+	+	−
腐生葡萄球菌，科氏葡萄球菌，木糖葡萄球菌		d	d	−	−	−	−	+	+	±	+	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−
克氏葡萄球菌，马葡萄球菌，阿尔莱特葡萄球菌		±	±	−	−	−	−	+	+	±	d	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−
中间葡萄球菌		−	+	−	−	−	−	+	+	+	+	±	+	+	−	+	+	−	+	+	−
松鼠葡萄球菌，缓慢葡萄球菌，小牛葡萄球菌		±	±	−	d	−	−	+	+	d	d	+	+	+	+	−	+	−	+	+	−
巨型球菌属[l]	38~45	±	±	−	d	−	−	+	+	±	d	ND	+	+	+	−	d	−	+	+	−
肠球菌属	34~42	−	+	−	−	−	d	+	+	(±)	±	(±)	−	−	−	+	d	+	+	+	−
链球菌属	34~46	−	+	d	−	−	−	d	d	−	−	−	−	−	−	+	d	+	−	d	−
气球菌属	35~40	−	+	−	+	−	−	+	+	+	−	ND	−	−	−	(+)	ND	+	ND	−	−
动性球菌属	39~52	+	−	−	d	−	+	+	+	+	−	ND	+	+	ND	−	−	+	ND	ND	−
差异球菌属	44~45	+	−	−	−	−	−	+	+	ND	ND	ND	±	−	−	ND	−	ND	ND	ND	ND
黏滑罗氏菌	56~60	−	+	−	d	+	−	−	−	−	−	ND	±	+	−	+	d	+	ND	−	d
微球菌属	66~75	+	−	−	+	−	−	+	+	d	−	−	+	+	+	−	−	+	−[m]	−	+
克氏库克菌	67	±	±	−	+	−	−	+	+	±	−	(±)	+	+	+	(+)	+	+	−	−	+

注：[a] +. 90%及以上菌种或菌株阳性；±. 90%及以上菌种或菌株弱阳性；−. 90%及以上菌种或菌株阴性；d. 11%～89%菌种或菌株阳性；ND. 不能确定，括号表示延迟反应。[b] P琼脂生长是指在有氧条件下，35～37℃生长。+. 可形成直径至少1 mm的可见菌落；±. 菌落直径0.5～1.0 mm。在绵羊或牛血琼脂上菌落生长略大但不能区分葡萄球菌和其他菌属。[c] 在有氧条件下，在35～37℃培养24～48 h。+. 菌落数量在选择性培养基与计数琼脂相当，形成直径0.5 mm菌落；±. 菌落数量在选择性培养基上比计数琼脂显著减少，括号表示形成针尖样到直径0.5 mm的菌落。[d] 一些触酶应为阴性的菌株有时可以发现触酶弱阳性或假阳性，一些菌株的触酶活性可以通过补充血红素激活。[e] 检测细胞色素的存在。一些联苯胺试验阴性的菌株可以在有氧环境下通过补充血红素合成细胞色素。[f] 使用盐酸四甲基对苯二胺浸润的纸片或试纸条检测氧化酶试验证明细胞色素c存在。[g] 标准氧化/发酵试验。[h] 纸片法，+表示耐药和无抑菌圈。微球菌属、库克菌属、皮肤球菌属、口腔球菌属和气球菌属是敏感的，抑菌圈直径10～25 mm。[i] 纸片法，+表示耐药和无抑菌圈或抑菌圈在9 mm以内。敏感菌种的抑菌圈直径15～35 mm。[j] 一些表皮葡萄球菌与琼脂表面紧密黏附与其产生大量黏液有关。[k] 人葡萄球菌在含有巯基乙酸盐的厌氧环境中孵育24 h无肉眼可见菌落生长，继续在此环境培养3～5天可有非常微小菌落生长。然而，它在厌氧环境生长和发酵葡萄糖(标准氧化发酵试验)。在含巯基乙酸盐的厌氧环境不生长，部分原因可能是培养基成分的抑制引起。[l] 巨型球菌不同于葡萄球菌在于前者革兰染色菌体较大(≥2 μm)，以及用 Not Ⅰ 消化产生更多的染色体片段数(12～36片段)。[m] 仅少数微球菌对红霉素高水平耐药(MIC≥50 μg/ml)

葡萄球菌属细菌主要的基因型的标准是DNA G+C含量低，为30～39 mol%。目前已经对很多葡萄球菌进行了全基因组测序（WGS），并获得全基因组序列的葡萄球菌包括金黄色葡萄球菌复合群（*S. aureus* complex）（COL、Mu3、Mu50、MW2、N315、NCTC8325、Newman、USA300-FPR3757、MRSA252和LGA251），艾格尼丝葡萄球菌（*S. agnetis*）（908）、假中间葡萄球菌（*S. pseudintermedius*）（HKU10-03、ED99和NA45）、一些凝固酶阴性葡萄球菌（CoNS）如头葡萄球菌（*S. capitis*）（AYP1020）、肉葡萄球菌（*S. carnosus*）（TM300和JCM6069）、科氏葡萄球菌（*S. cohnii*）（SNUDS-2）、香料葡萄球菌（*S. condimenti*）（DSM11674和StO 2014-01）、表皮葡萄球菌（*S. epidermidis*）（ATCC 12228、RP62A和PM221）、马葡萄球菌（*S. equorum*）（KS1039、C2014和KM1031）、溶血葡萄球菌（*S. haemolyticus*）（JCSC1435）、路邓葡萄球菌（*S. lugdunensis*）（N920143和HKU09-01）、巴斯德葡萄球菌（*S. pasteuri*）（SP1）、腐生葡萄球菌（*S. saprophyticus*）（ATCC15305）、施氏葡萄球菌（*S. schleiferi*）（2317-03、TSCC54和1360-13）、猴葡萄球菌（*S. simulans*）（FDAARGOS_124）、琥珀葡萄球菌（*S. succinus*）（14BME20）、沃氏葡萄球菌（*S. warneri*）（SG1）和木糖葡萄球菌（*S. xylosus*）（HKUOPL8、SMQ-121和C2a）。金黄色葡萄球菌单链染色体基因全长2.8～2.9 Mbp（全长中位数为2.85 Mbp），G+C含量的中位数是32.8 mol%。基因组比较分析发现，该菌种的泛基因组（pan-genome）[超基因组（supragenome）]由3221个基因组成，其中包括2245个核心基因[3]。大量的移动DNA元件已被确定。葡萄球菌最常出现的是包含小的、多拷贝和（或）大的、接合多耐药质粒（conjugative multiresistance plasmids）（Ⅰ～Ⅲ类）。详细情况和其他葡萄球菌情况可以查阅NCBI基因组数据库（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome）。

截至2017年12月，人们已经发现49种，包括25个亚种的葡萄球菌（所有种及亚种的列表，表22-4）。已提议命名另一个凝固酶阴性的菌种——土壤葡萄球菌（*S. edaphicus*）[4]。从1925年开始，通过检测血浆凝固酶试验将葡萄球菌分为凝固酶阳性葡萄球菌["金黄色葡萄球菌群"（"*S. aureus* group"）]和凝固酶阴性葡萄球菌（表22-4）。除金黄色葡萄球菌金黄色亚种外，已经发现了更多的动物相关的凝固酶阳性（或可变）菌种和亚种，包括艾格尼丝葡萄球菌、金黄色葡萄球菌厌氧亚种、海豚葡萄球菌（*S. delphini*）、猪葡萄球菌（*S. hyicus*）、中间葡萄球菌（*S. intermedius*）、水獭葡萄球菌（*S. lutrae*）、假中间葡萄球菌和施氏葡萄球菌凝聚亚种（*S. schleiferi* subsp. *coagulans*）。最近，从金黄色葡萄球菌中划出了2个新命名的菌种：首先是非人类-灵长类寄生的*S. schweitzeri*[旧称金黄色葡萄球菌序列型2022（ST2022）等]和银色葡萄球菌（*S. argenteus*），银色葡萄球菌包括旧称金黄色葡萄球菌克隆复合体（clonal complex，CC）75等的早期分支谱系[5]。现在它们包括金黄色葡萄球菌相关的复合群。除特别声明外，在本章中使用"金黄色葡萄球菌"的术语指的范围与之前一样。

随后又将凝固酶阴性葡萄球菌（CoNS）分为新生霉素敏感["表皮葡萄球菌群"（"*S. epidermidis* group"）]和新生霉素耐药["腐生葡萄球菌群"（"*S. saprophyticus* group"）]。历史上，表皮葡萄球菌群包括与该群同名的表皮葡萄球菌、头葡萄球菌、溶血葡萄球菌、人葡萄球菌人亚种（*Staphylococcus hominis* subsp. *hominis*）、路邓葡萄球菌、解糖葡萄球菌和沃氏葡萄球菌。此外，其他多个菌种也对新生霉素敏感（见本手册之前的版本）。腐生葡萄球菌的2个亚种和一些凝固酶阴性葡萄球菌对新生霉素耐药（如科氏葡萄球菌、克氏葡萄球菌和木糖葡萄球菌）。尽管有局限，凝固酶试验和新生霉素敏感性试验仍用于推定临床分离株的鉴别。

表 22-4 葡萄球菌属区别

菌种	特征[a]																	
						表达												
	大菌落[b]	菌落色素[c]	厌氧生长[d]	需氧生长[e]	凝固酶试验	凝集因子[f]	耐热核酸酶	溶血[g]	触酶[h]	氧化酶[i]	碱性磷酸酶	精氨酸芳胺酶	吡咯烷酮芳胺酶[j]	鸟氨酸脱羧酶	脲酶[j]	β-葡糖苷酶[j]	β-葡糖醛酸糖苷酶[j]	β-半乳糖苷酶[j]
艾格尼丝葡萄球菌	+	−	+	+	d	−	ND	−	+	−	−	−	−	−	−	ND	d	−
阿根葡萄球菌	−	+	ND	+	−	ND	ND	ND	+	−	ND	ND	ND	+	−	ND	−	ND
阿尔莱特葡萄球菌	d	+	−	+	−	−	−	−	+	−	(+)	−	−	−	−	ND	+	d
金黄色葡萄球菌厌氧亚种	−	−	(+)	(±)	+	−	+	+	−	−	+	ND	ND	ND	ND	−	−	−
金黄色葡萄球菌[m] 金黄色亚种	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	d	+	−	−
耳葡萄球菌	−	−	(±)	(+)	−	−	−	−	+	−	−	+	d	−	−	−	−	(d)
头葡萄球菌头亚种	−	−	(+)	+	−	−	−	(d)	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
头葡萄球菌解脲亚种	−	(d)	(+)	+	−	−	−	(d)	+	−	−	−	(d)	−	+	−	−	−
山羊葡萄球菌	d	−	(+)	+	−	−	−	(d)	+	−	(+)	−	d	−	+	−	−	−
肉葡萄球菌肉亚种	+	−	+	+	−	−	−	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−	+
肉葡萄球菌有益亚种	−	−	+	+	−	ND	ND	ND	+	ND	−	ND	ND	ND	−	ND	−	−
产色葡萄球菌	+	+	+	+	−	−	−	−	+	−	+	−	d	−	+	d	−	−
科氏葡萄球菌科氏亚种	d	−	d	+	−	−	−	(d)	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
科氏葡萄球菌解脲亚种	+	d	(+)	+	−	−	−	(d)	+	−	+	−	d	−	+	−	+	+
香料葡萄球菌	ND	d	+	+	−	ND	ND	ND	+	ND	+	ND	ND	ND	+	ND	−	+
海豚葡萄球菌	+	−	(+)	+	+	−	−	+	+	−	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND
德氏葡萄球菌	+	+	(+)	+	−	−	ND	+	+	−	−	ND	ND	ND	d	+	−	−
表皮葡萄球菌	−	−	+	+	−	−	−	(d)	+	−	+[n]	−	−	(d)	+	(d)	−	−
马葡萄球菌马亚种	−	−	−	(+)	−	−	−	(d)	+	−	(+)	−	−	−	+	ND	+	d
马葡萄球菌涂散亚种	ND	−	−	(+)	−	−	−	(d)	+	−	d	−	−	−	+	ND	+	−
猫葡萄球菌	+	−	+	+	−	−	−	(d)	+	−	+	ND	ND	ND	+	−	−	+
弗氏葡萄球菌	−	−	+	+	−	−	−	ND	+	+	d	−	−	−	−	ND	−	−
鸡葡萄球菌	+	d	(+)	+	−	−	−	(d)	+	−	(+)	−	−	−	+	+	d	d
溶血葡萄球菌	+	d	(+)	+	−	−	−	(+)	+	−	−	−	+	−	−	d	d	−
人葡萄球菌人亚种	−	d	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−
人葡萄球菌耐新生霉素败血亚种[o]	−	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	ND	−	−	+	−	−	−
猪葡萄球菌	+	−	+	+	d	−	+	−	+	−	+	−	−	−	d	d	+	−

菌种	特征[a]																	
	表达							产酸(需氧)										
	精氨酸利用[j]	产3-羟基丁酮	硝酸盐还原	七叶苷水解	新生霉素耐药[k]	多黏菌素B耐药[l]	D-海藻糖	D-甘露醇	D-甘露糖	D-松二糖	D-木糖	D-纤维二糖	L-阿拉伯糖	麦芽糖	α-乳糖	蔗糖	N-乙酰氨基葡糖	棉子糖
艾格尼丝葡萄球菌	ND	−	+	−	−	+	d	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	−
阿根葡萄球菌	−	ND	−	ND	−	ND	−	−	ND	−	−	−	ND	−	−	+	ND	ND
阿尔莱特葡萄球菌	−	ND	−	−	+	ND	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+
金黄色葡萄球菌厌氧亚种	ND	−	−	−	−	ND	−	ND	−	ND	−	−	−	+	−	+	−	−
金黄色葡萄球菌[m] 金黄色亚种	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	−
耳葡萄球菌	d	−	(d)	−	−	−	(+)	−	−	(d)	−	−	−	(+)	−	d	−	−
头葡萄球菌头亚种	d	d	d	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	−	(+)	−	−
头葡萄球菌解脲亚种	+	d	+	−	−	ND	−	+	+	−	−	−	−	+	(d)	+	−	−
山羊葡萄球菌	+	+	+	−	−	−	(+)	d	+	−	−	−	−	(d)	+	−	−	−
肉葡萄球菌肉亚种	+	+	+	−	−	−	d	+	+	−	−	−	−	−	d	−	ND	−
肉葡萄球菌有益亚种	+	ND	d	−	ND	ND	d	−	−	−	ND	−	−	−	−	−	ND	−
产色葡萄球菌	+	−	+	−	−	+	+	d	+	d	−	−	−	d	+	+	d	−
科氏葡萄球菌科氏亚种	−	d	−	−	+	−	+	d	(d)	−	−	−	−	(d)	−	−	−	−
科氏葡萄球菌解脲亚种	−	d	−	−	+	−	+	+	+	−	−	−	−	(+)	+	−	d	−
香料葡萄球菌	+	ND	+	−	ND	ND	+	+	+	−	ND	−	−	−	+	±	ND	−
海豚葡萄球菌	+	−	+	ND	−	ND	−	(+)	+	ND	−	ND	−	+	+	+	ND	ND
德氏葡萄球菌	ND	ND	d	±	−	ND	+	d	d	+	−	−	−	+	+	+	d	−
表皮葡萄球菌	d	+	+	−	−	+	−	−	(+)	(d)	−	−	−	+	d	+	−	−
马葡萄球菌马亚种	−	−	+	d	+	ND	+	+	+	d	+	(d)	+	d	d	+	d	−
马葡萄球菌涂散亚种	ND	−	+	−	−	ND	−	ND	+	±	−	−	−	−	−	−	ND	ND
猫葡萄球菌	+	−	+	ND	−	ND	+	+	+	ND	−	−	−	−	+	d	+	−
弗氏葡萄球菌	−	d	+	d	+	ND	+	ND	+	+	d	−	d	+	−	+	ND	−
鸡葡萄球菌	−	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+
溶血葡萄球菌	+	+	+	−	−	−	+	d	−	(d)	−	−	−	+	d	+	+	−
人葡萄球菌人亚种	d	d	d	−	−	−	d	−	−	+	−	−	−	+	d	(+)	d	−
人葡萄球菌耐新生霉素败血亚种[o]	−	d	d	−	+	ND	−	−	−	ND	−	−	−	+	d	(+)	−	−
猪葡萄球菌	+	−	+	−	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	−

（续 表）

菌种	特征[a]																																			
	表达																							产酸（需氧）												
	大菌落[b]	菌落色素[c]	厌氧生长[d]	需氧生长[e]	凝固酶试验	凝集因子[f]	耐热核酸酶	溶血[g]	触酶[h]	氧化酶[i]	碱性磷酸酶	精氨酸芳胺酶	吡咯烷酮芳胺酶[j]	鸟氨酸脱羧酶	脲酶[j]	β-葡糖苷酶[j]	β-葡糖醛酸糖苷酶[j]	β-半乳糖苷酶[j]	精氨酸利用[j]	产3-羟基丁酮	硝酸盐还原	七叶苷水解	新生霉素耐药[k]	多黏菌素B耐药[l]	D-海藻糖	D-甘露醇	D-甘露糖	D-松二糖	D-木糖	D-纤维二糖	L-阿拉伯糖	麦芽糖	α-乳糖	蔗糖	N-乙酰氨基葡糖	棉子糖
中间葡萄球菌	+	−	(+)	+	+	d	+	d	+	−	+	−	+	−	+	d	−	+	d	−	+	−	−	−	+	(d)	+	d	−	−	−	(±)	d	+	+	−
克氏葡萄球菌	d	d	−	+	−	−	−	(d)	+	−	d	−	d	−	d	d	d	d	−	d	−	d	+	−	+	+	−	−	(d)	−	d	d	(d)	(±)	−	−
缓慢葡萄球菌	−	d	(±)	(+)	−	−	−	−	+	+	(±)	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+	+	+	−	+	+	(+)	(±)	(±)	+	d	d	d	+	d	+
路邓葡萄球菌	d	d	+	+	−	(+)	−	(+)	+	−	−	−	+	+	d	+	−	−	−	+'	+	−	−	d	+	−	+	(d)	−	−	−	+	+	+	+	−
水獭葡萄球菌	−	−	+	+	+	−	(±)	+	+	−	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	−	−	+	ND	−	ND	+	d	+	ND	+	ND	ND	+	+	ND	ND	ND
马赛葡萄球菌	+	−	±	+	−	−	ND	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	ND	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
田鼠葡萄球菌	+	−	ND	+	−	−	ND	+	+	−	+	+	+	−	−	−	−	+	ND	±	+	+	+	−	+	−	±	−	+	−	−	−	+	+	+	−
蝇葡萄球菌	d	−	+	+	−	−	−	(+)	+	−	+	ND	ND	−	−	ND	ND	−	−	−	ND	ND	−	ND	+	−	−	+	+	−	−	−	−	+	ND	−
尼泊尔葡萄球菌	−	−	+	+	−	−	−	−	+	−	+	−	+	−	+	ND	+	+	−	−	+	+	+	−	+	+	+	d	+	−	+	+	+	+	+	−
巴斯德葡萄球菌	d	d	+	+	−	−	−	(d)	+	−	−	−	−	−	+	+	+	−	d	d	d	−	−	ND	+	d	−	(d)	−	−	−	(d)	d	+	ND	−
S. petrasii subsp. *croceilyticus*	−	+	−	+	−	−	−	±	+	−	d	ND	+	−	+	+	+	−	+	+	d	−	−	ND	+	−	−	±	−	−	+	+	−	+	ND	−
S. petrasii subsp. *jettensis*	−	(+)	+	+	−	−	ND	±	+	−	d	+	d	−	−	d	d	−	+	+	d	−	−	ND	+	+	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−
彼德拉斯葡萄球菌彼德拉斯亚种（*S. petrasii* subsp. *petrasii*）	−	−	−	+	−	−	−	±	+	−	d	ND	+	−	+	−	−	−	+	+	+	−	−	ND	+	d	+	±	−	−	−	+	d	+	ND	−
S. petrasii subsp. *pragensis*	−	−	ND	+	−	−	−	±	+	−	d	+	+	−	−	d	ND	−	d	+	d	−	−	−	d	−	−	d	−	−	−	+	d	+	−	−
佩滕科夫葡萄球菌	ND	d	+	+	−	−	ND	ND	+	−	+	−	+	−	+	ND	−	−	ND	−	+	ND	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	ND	−
鱼发酵葡萄球菌	ND	d	+	+	−	ND	−	−	+	−	+	ND	ND	ND	+	+	−	−	+	−	+	+	−	ND	+	d	−	−	−	−	−	d	d	d	ND	−
假中间葡萄球菌	+	−	ND	+	+	−	+	+	+	ND	+[p]	ND	+	ND	+	+	−	+	ND	+	+	ND	−	ND	+	(+)	+	(+)	−	−	−	+	+	+	+	−
猪鼻葡萄球菌	+	−	+	+	−	−	−	+	+	−	+	−	+	−	−	ND	−	−	−	−	+	±	−	ND	+	−	−	−	ND	−	−	−	d	+	+	−
解糖葡萄球菌	−	−	+	(±)	−	−	−	−	−	−	d	−	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	+	ND	−	ND	−	−	(+)	ND	−	−	−	−	−	−	ND	−
腐生葡萄球菌牛亚种	−	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+	d	−	d	−	d	+	−	+	ND	+	+	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−
腐生葡萄球菌腐生亚种	+	d	(+)	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	+	d	−	+	−	+	−	−	+	−	+	d	−	+	−	−	−	+	d	+	d	−
施氏葡萄球菌凝聚亚种	d	−	+	+	+	−	+	(+)	+	−	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	+	+	+	ND	−	ND	−	d	+	ND	−	−	−	−	d	d	ND	−
施氏葡萄球菌施氏亚种	−	−	+	+	−	+	+	(+)	+	−	+	−	+	−	−	−	−	(+)	+	+	+	−	−	−	d	−	+	−	−	−	−	−	−	−	(+)	−
松鼠葡萄球菌肉亚种[q]	−	d	(d)	+	−	d[r]	−	(±)	+	+	d	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+	+	+	−	+	+	(d)	ND	+	(d)	d	(d)	(d)	+	−	−
松鼠葡萄球菌啮齿亚种[q]	d	d	(d)	+	−	+[r]	−	(±)	+	+	d	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+	+	+	−	(+)	+	(+)	ND	(d)	d	(d)	(d)	−	+	−	−
松鼠葡萄球菌松鼠亚种[q]	+	d	(+)	+	−	−	−	(±)	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+	+	+	−	+	+	(d)	(±)	(d)	+	d	(d)	(d)	+	−	−
猿葡萄球菌	ND	−	+	+	−	−	−	ND	+	−	+	−	−	−	+	ND	−	−	ND	−	+	−	−	+	+	+	−	+	d	−	d	+	+	+	(+)	−

（续 表）

菌种	特征[a]																																			
					表达																				产酸（需氧）											
	大菌落[b]	菌落色素[c]	厌氧生长[d]	需氧生长[e]	凝固酶试验	凝集因子[f]	耐热核酸酶	溶血[g]	触酶[h]	氧化酶[i]	碱性磷酸酶	精氨酸芳胺酶	吡咯烷酮芳胺酶[j]	鸟氨酸脱羧酶	脲酶[j]	β-葡糖苷酶[j]	β-葡糖醛酸糖苷酶[j]	β-半乳糖苷酶[j]	精氨酸利用[j]	产3-羟基丁酮	硝酸盐还原	七叶苷水解	新生霉素耐药[k]	多黏菌素B耐药[l]	D-海藻糖	D-甘露醇	D-甘露糖	D-松二糖	D-木糖	D-纤维二糖	L-阿拉伯糖	麦芽糖	α-乳糖	蔗糖	N-乙酰氨基葡糖	棉子糖
猴葡萄球菌	+	−	+	+	−	−	−	(d)	+	−	(d)	−	+	−	+	−	d	+	+	d	+	−	−	−	d	+	d	−	−	−	−	(±)	+	+	+	−
斯德潘罗夫葡萄球菌	+	−	ND	+	−	−	ND	ND	+	+	−	−	−	−	+	ND	−	−	ND	−	+	−	+	+	+	+	+	−	ND	−	−	+/±	−	+	−	−
琥珀葡萄球菌干酪亚种	ND	−	−	(+)	ND	ND	ND	−	+	−	±	−	−	−	+	ND	+	+	ND	−	+	+	+	ND	+	+	+	+	±	−	−	+	+	+	ND	−
琥珀葡萄球菌琥珀亚种	ND	−	−	(+)	ND	ND	ND	−	+	−	+	−	−	−	+	ND	+	+	ND	−	−	+	+	ND	+	+	d	±	−	±	−	+	+	+	ND	−
小牛葡萄球菌	−	+	±	+	−	−	−	±	+	+	−	ND	−	−	−	d	−	−	−	−	+	d	+	ND	(d)	−	−	−	d	d	−	−	−	+	−	−
沃氏葡萄球菌	d	d	+	+	−	−	−	(d)	+	−	−	−	−	−	+	+	d	−	d	+	d	−	−	−	+	d	−	(d)	−	−	−	(+)	d	+	−	−
木糖葡萄球菌	+	d	d	+	−	−	−	−	+	−	d	−	d	−	+	+	+	+	−	d	d	d	+	−	+	+	+	d	+	−	d	+	d	+	+	−

注：[a] +. 90%及以上菌株阳性；±. 90%及以上菌株弱阳性；−. 90%及以上菌株阴性；d. 11%～89%菌株阳性；ND. 不能确定，括号表示延迟反应。[b] 阳性表示在P琼脂34～35℃孵育3天后继续在室温（大约25℃）孵育2天可形成直径≥6 mm的可见菌落，除琥珀葡萄球菌在胰酶大豆琼脂形成4～6 mm菌落和弗氏葡萄球菌在胰酶大豆琼脂形成8～12 mm菌落外。[c] 阳性表示在正常的孵育条件或室温下形成可见的类胡萝卜素颜色（黄色、橙黄色或橙色）的菌落。P琼脂添加牛奶、脂肪、甘油一乙酸酯或者肥皂可以使色素增强。[d] 在硫乙醇酸盐半固体培养基上的生长情况；+. 孵育18～24 h管的下层中度或大量生长；±表示管的上层部分大量生长和管下层厌氧部分弱生长；−. 48 h内没有明显生长，但是在孵育72～96 h管的下层可能观察到很弱的扩散生长或少数几个散在的小菌落。括号表示在24～72 h出现延迟生长，有时指在管的下层有较大的散在菌落。[e] 在P琼脂或牛、绵羊或人血琼脂34～37℃生长。马葡萄球菌的亚种和琥珀葡萄球菌的亚种在35～37℃生长缓慢；马葡萄球菌马亚种和马葡萄球菌涂散亚种最适生长温度分别是30℃和32℃，琥珀葡萄球菌琥珀亚种和琥珀葡萄球菌干酪亚种最适生长温度分别是28℃和32℃。厌氧菌种解糖葡萄球菌和金黄色葡萄球菌厌氧亚种在空气中生长非常缓慢。金黄色葡萄球菌厌氧亚种初次分离需要在培养基增加血液、血清或卵黄。耳葡萄球菌、缓慢葡萄球菌和小牛葡萄球菌在P琼脂孵育24～36 h有肉眼可见菌落，这些菌落非常小（直径1～2 mm）。[f] 玻片凝集法使用兔或人血浆检测凝集因子，使用人血浆检测路邓葡萄球菌和施氏葡萄球菌，使用乳胶凝集法检测路邓葡萄球菌的凝集因子结果不可靠。[g] 在含牛血琼脂上的溶血情况，符号和缩写：+. 24～36 h有宽大的溶血环；(+). 48～72 h延迟出现的中到大的溶血环；(d). 无或迟发溶血；−表示72 h内无或狭窄溶血（1 mm）。一些阴性菌株可以在血平板产生绿色或棕色。应在含5%绵羊血的Wilkins-Chalgren厌氧琼脂上观察2种琥珀葡萄球菌亚种的溶血。[h] 金黄色葡萄球菌厌氧亚种在添加过氧化氢或血红素的培养基上不能诱导产生触酶和细胞色素。解糖葡萄球菌在添加血红素的培养基上可诱导触酶活性。该菌种中含有少量的细胞色素a和b。[i] 改良氧化酶试验检测细胞色素c。[j] 主要是使用商品化快速鉴定试验来鉴定。[k] 阳性（耐药）指MIC≥1.6 μg/ml或5 μg新生霉素纸片法抑菌圈直径≥16 mm（译者注：11版抑菌圈直径≤16 mm）（译者注：新生霉素耐药试验方法是用CLSI标准纸片扩散法，试验平板为MH平板）。[l] 阳性指300 U多黏菌素B纸片法抑菌圈直径<10 mm。[m] 最近，银色葡萄球菌和*S. schweitzeri*被描述为与金黄色葡萄球菌相关的复合群的一部分。没有生化试验能明确区分金黄色葡萄球菌金黄色亚种和2个新划界的菌种。银色葡萄球菌的菌落无色素，外观呈乳白色，*S. schweitzeri*菌落外观呈淡黄色[5]。[n] 由于取样菌群不同，表皮葡萄球菌有6%～15%碱性磷酸酶阴性。小部分但有统计学显著意义的临床菌株的磷酸酶阴性。[o] 测试的所有菌株对青霉素G、甲氧西林、苯唑西林、庆大霉素和链霉素耐药。[p] STAPH-ZYM阳性而API STAPH阴性。[q] 松鼠葡萄球菌的亚种分类最近被否决[247]。[r] 葡萄球菌乳胶凝集试验（Remel）阳性，该反应检测凝集因子和（或）蛋白A

原名为解酪葡萄球菌(解酪微球菌)[*Staphylococcus*(*Micrococcus*) *caseolyticu*]的菌种现更名为解酪巨型球菌(*Macrococcus caseolyticus*),由此从葡萄球菌属中分离出一个新的菌属——巨型球菌属(*Macrococcus*)。巨型球菌属菌体与葡萄球菌相似,但其直径较大,部分菌种直径可达 2.5 μm,也因此命名了它们的属名。巨型球菌属被认为是葡萄球菌形成之前更早的菌种[6]。在 JCSC5402 菌株全基因序列中,解酪巨型球菌的 DNA G+C 含量是 36.9 mol%[6]。与其他巨型球菌细胞壁不同,解酪巨型球菌的细胞壁含有磷壁酸。*Aliicoccus*、*Corticicoccus* 和医院球菌属(*Nosocomiicoccus*)的 DNA G+C 含量与葡萄球菌类似,其他菌属如 *Abyssicoccus*、盐水球菌属(*Salinicoccus*)和酱球菌属(*Jeotgalicoccus*)等其他菌种的 DNA G+C 含量均比葡萄球菌高。盐水球菌属是专性需氧,而其他菌种是兼性厌氧。

(二)微球菌科和皮生球菌科

大多数革兰阳性、无芽胞的微球菌科和皮生球菌科的菌株特点是无动力、球形,直径 0.5~1.8 μm,四联和成簇排列,但有一些菌属的细菌呈杆状[如耳炎杆菌属(*Auritidibacter*)、温泉杆菌属(*Calidifontibacter*)和中华单胞菌属(*Sinomonas*)]。节杆菌属(*Arthrobacter*)、罗氏菌属(*Rothia*)和其他菌属的菌种可呈不规则球形。除黏滑罗氏菌外,最后 2 种菌属均在本书第 29 章讲述。微球菌科和皮生球菌科 G+C 含量在 52~75 mol%。

微球菌科包括许多专性需氧菌和嗜温(mesophilic)菌株。微球菌属作为微球菌科的模式菌属,包括经典的藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)和里拉微球菌(*M. lylae*)。以前属于微球菌属的部分菌种目前归入库克菌属,如克氏库克菌(*Kocuria kristinae*)、变异库克菌(*K. varians*)和玫瑰色库克菌(*K. rosea*)[需要说明的是,以前的玫瑰色微球菌(*Micrococcus roseus*)与金色佩尔泽菌(*Pelczaria aurantia*)合并成一个种,即玫瑰色库克菌。][7]。盐生微球菌(*Micrococcus halobius*)被归于新的涅斯捷连科菌属,更名为盐生涅斯捷连科菌(*Nesterenkonia halobia*)。对于所有这些菌属,已经发现了一些新菌种。本章引用术语"微球菌"("micrococci")用来表示在修订之前是微球菌属的成员,可反映大部分临床相关菌株[7]。

2 种以前属于微球菌属的细菌——西宫微球菌(*Micrococcus nishinomiyaensis*)和久坐微球菌(*Micrococcus sedentarius*),现在归于皮生球菌科(*Dermacoccaceae*)。西宫微球菌现归入皮生球菌科的皮生球菌属(*Dermacoccus*),即西宫皮生球菌(*D. nishinomiyaensis*)。久坐微球菌现归入皮生球菌科的皮肤球菌属(*Kytococcus*),即久坐皮肤球菌(*K. sedentarius*),该菌属还包括近期发现的施勒特皮肤球菌(*K. schroeteri*)和气生皮肤球菌(*K. aerolatus*)。

临床样本中鉴定微球菌科和皮生球菌科的关键试验列入表 22-5 中。

表 22-5　临床标本中微球菌科和皮生球菌科细菌鉴定的关键试验

菌种	试验结果														
										产酸(需氧)					
	菌落色素	硝酸盐还原	β-半乳糖苷酶	β-葡糖醛酸糖苷酶	α-D-葡糖苷酶	精氨酸水解酶	脲酶	明胶水解	吐温80水解	D-甘露糖	乳糖	蔗糖	D-海藻糖	D-木糖	D-甘露醇
嗜肉库克菌	黄色	+	+	+	ND	−	−	−	−	−	+	±	−	−	−
克氏库克菌	淡奶油色或淡橙色	d	−	−	ND	−	d	±	−	+	d	+	+	−	−
Kocuria marina	ND	+	+	ND	ND	−	+	+	−	+	+	+	ND	−	−
嗜根库克菌	黄色	−	−	−	ND	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−
玫瑰色库克菌	淡红或橙红色	+	−	−	ND	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
变异库克菌	不同深浅的(暗)黄色	+	+	−	−	−	+	±	−	−	d	d	−	+	−

（续 表）

菌种	菌落色素	试验结果													
										产酸(需氧)					
		硝酸盐还原	β-半乳糖苷酶	β-葡糖醛酸糖苷酶	α-D-葡糖苷酶	精氨酸水解酶	脲酶	明胶水解	吐温80水解	D-甘露糖	乳糖	蔗糖	D-海藻糖	D-木糖	D-甘露醇
藤黄微球菌	不同深浅的黄色、黄绿色或乳白色	—	ND	ND	+	—	d	+	—	d	—	d	—	—	—
里拉微球菌	无色或乳白色	—	ND	ND	ND	—	—	+	d	—	—	—	+	—	—
西宫皮生球菌	亮橙色	d	ND	ND	ND	—	+	+	d	—	—	d	ND	—	ND
施勒特皮肤球菌	泥黄色	—	—	ND	—	+	—	+	+	—	ND	d	+	—	—
久坐皮肤球菌	奶油白至深毛茛黄色	—	ND	ND	+	+	—	+	—	d	—	d	+	—	ND
黏滑罗氏菌	透明或白色	+	ND	ND	+	—	—	+	—	+	—	+	+	—	—

注：+. 90%及以上菌株阳性；±. 90%及以上菌株弱阳性；—. 90%及以上菌株阴性；d. 11%～89%菌株阳性；ND. 不能确定，括号代表延迟反应

(三)差异球菌属

差异球菌属隶属于肉杆菌科(*Carnobacteriaceae*)，其属内唯一菌种为耳炎差异球菌(*Alloiococcus otitis*)。需要指出的是，耳炎差异球菌的菌名发生过修订，"*A. otitis*" 是符合命名法的正式名称，但是，修订前的名称"*A. otitidis*"仍经常出现在文献中。该菌为生长缓慢的革兰阳性椭球菌，多成簇或成对排列。差异球菌为需氧菌，但烛缸法培养有稀疏生长，G+C 含量为 44～45 mol%。

三、流行病学和传播

(一)葡萄球菌属

大多数葡萄球菌菌种是哺乳动物和鸟类定植菌群的一部分，主要分布在皮肤和黏膜。金黄色葡萄球菌金黄色亚种是葡萄球菌属内对人类致病的最主要病原体，其次是表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、腐生葡萄球菌腐生亚种和路邓葡萄球菌。人体标本中也可以分离到葡萄球菌的其他种和亚种，包括耳葡萄球菌(*S. auricularis*)、头葡萄球菌头亚种(*S. capitis* subsp. *capitis*)、头葡萄球菌解脲亚种(*S. capitis* subsp. *urealyticus*)、山羊葡萄球菌(*S. caprae*)、科氏葡萄球菌科氏亚种(*S. cohnii* subsp. *cohnii*)、科氏葡萄球菌解脲亚种(*S. cohnii* subsp. *urealyticus*)、人葡萄球菌人亚种(*S. hominis* subsp. *hominis*)、人葡萄球菌耐新生霉素败血亚种(*S. hominis* subsp. *novobiosepticus*)、马赛葡萄球菌(*S. massiliensis*)、巴斯德葡萄球菌、彼德拉斯葡萄球菌(*S. petrasii*)及其亚种、佩滕科夫葡萄球菌(*S. pettenkoferi*)、解糖葡萄球菌、施氏葡萄球菌施氏亚种(*S. schleiferi* subsp. *schleiferi*)、猿葡萄球菌(*S. simiae*)、猴葡萄球菌、沃氏葡萄球菌和木糖葡萄球菌。

1. 金黄色葡萄球菌和其他凝固酶阳性葡萄球菌 金黄色葡萄球菌主要寄生在人鼻腔，尤其是鼻前庭后部[8-9]。对一般人群来说，最近已经确定鼻腔内金黄色葡萄球菌的总携带率达到 41%[10]。根据各项研究中包括的参与者的类型(如患者、医护人员、偏远地区人群和健康志愿者)，报道的鼻腔金黄色葡萄球菌携带率从不足 10% 到超过 50%[11]。纵向研究发现，鼻腔金黄色葡萄球菌存在 3 种不同类型的携带情况：持续携带者(占 10%～35%，长期携带一种菌株)、间断携带者(占 20%～75%，携带不同的菌株)和非携带者(5%～50%)。由于鼻腔间断性携带和无携带的金黄色葡萄球菌消除动力学相似，所以最近提出只有 2 种类型的鼻腔携带状态：持续携带者和其他[12]。通过鼻腔，金黄色葡萄球菌可以转移到皮肤和身体的其他部位。咽喉、肠道、阴道、破损的皮肤褶皱、腋窝及会阴也是常见的金黄色葡萄球菌的定植部位。在部分金黄色葡萄球菌携带者中仅发现

咽喉或会阴部位的定植而没有鼻腔内的定植。使用增强的培养流程的研究，包括肉汤增菌和（或）对身体多个部位，尤其是鼻腔、咽喉和会阴的擦拭取样显示，＞50％的受试者有金黄色葡萄球菌定植[8,13]。

医护人员、胰岛素依赖型糖尿病患者、长期接受血液透析的患者、非法静脉用药者鼻腔金黄色葡萄球菌携带率高于正常的结论目前还有争议，因为有一些研究不支持早期的发现。值得一提的是，鼻腔定植菌在侵袭性感染时作为感染源扮演了关键的角色[14-16]。

金黄色葡萄球菌菌群表现为高度克隆化结构。通过多位点序列分型（multilocus sequence typing，MLST），金黄色葡萄球菌可根据序列型（STs）分群[目前已经报道的大约有 3200 种序列型（www. mlst. net）]（译者注：MLST 网址可选 https://pubmlst. org/）。序列型以克隆复合型（CCs）排列[17]。对一般人群来说，金黄色葡萄球菌具有高度变异性[18]。医疗系统中常见的金黄色葡萄球菌谱系由 MLST CCs1，5，8，15，22，30，45，59，80，97，121 和 398 构成[19-20]。金黄色葡萄球菌也可以根据 *agr*[附属基因调节系统（accessory gene regulator system）]等位基因变异分为 4 组[21]。

在医疗保健机构内，金黄色葡萄球菌主要是通过医务人员的手和物品在患者之间传播。这对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）传播是至关重要的。除重症监护室和烧伤科之外的区域，外部环境在造成的细菌播散中的作用是次要的。定植或感染的医务人员可以作为细菌宿主。

转移缺陷的 ST250-SCC*mec* Ⅰ克隆形成的第一波 MRSA 感染发生在 20 世纪 60 或 70 年代的丹麦、英国和其他一些欧洲国家及澳大利亚，但这次并未影响到全球。第二波感染始于 20 世纪 80 年代，医疗保健相关 MRSA（health care-associated MRSA，HA-MRSA）中相对较少的谱系（特别是 CCs5、8、22 和 45）出现成功的播散。这一波感染仍在持续，在 21 世纪 00 年代社区相关 MRSA（community-associated MRSA，CA-MRSA）及随后的家畜相关 MRSA（livestock-associated MRSA，LA-MRSA）出现之前，HA-MRSA 的上述谱系仍旧是 MRSA 的主要流行株（见下文）。世界范围内 HA-MRSA 患病率存在差异。在美国某些地区，金黄色葡萄球菌中 MRSA 的比例暂时达到 50％以上[22]。2015 年，欧洲 MRSA 的比例取人口加权平均后是 16.8％，在诸如荷兰、冰岛和斯堪的纳维亚国家中 MRSA 的比例非常低（＜2％），在地中海和巴尔干半岛的国家 MRSA 比例较高（从接近 20％到＞50％）[23]。在亚洲、澳洲和非洲，MRSA 发生率也很高（20％～80％）[24-26]。然而，在世界的某些地区（美国和欧洲大部分国家）MRSA 感染率出现稳定甚至降低的迹象[23,27]。

2000 年左右由于 CA-MRSA（第三波）和 LA-MRSA（第四波）的出现，进一步增加了 MRSA 的全球性感染负担[28-34]。CA-MRSA 之所以特别，是因为它们可以在选择性医疗保健环境之外生存、传播并引起感染，但在医疗保健机构中也可以发现这些细菌并由此引发医疗保健相关感染。CA-MRSA 和 HA-MRSA 之间的流行病学界限已经变得模糊[35]。CA-MRSA 分离株在 20 世纪 80 年代末首次在澳大利亚原住民中发现，但在 20 世纪 90 年代末首次在全球范围内发现，当时在世界各地出现了多种 CA-MRSA 的谱系。在美国，脉冲场凝胶电泳（pulsed-field gel electrophoresis，PFGE）USA400 型（ST1-Ⅳ）和随后的 USA300 型（ST8-Ⅳ；*spa* 型 t008）是最普遍的克隆[36-39]。在世界其他地区，已经报道了一系列不同的 CA-MRSA 克隆株，如欧洲、北非和中东的 ST80-Ⅳ（*spa* 型 t044），澳洲和亚洲的 ST30-Ⅳ（“西南太平洋克隆”），亚洲的 ST59-Ⅴ和 ST772（“孟加拉湾克隆”），非洲的 ST88 和 ST1797 及澳洲的 ST93-Ⅳ[24-25,40-42]。虽然不同的 CA-MRSA 克隆最初在地理上是隔离的，但这些菌株已经在全球范围内更广泛地传播，尤其是 USA300 型[41-45]。最近使用全基因组测序的研究已经描述了 USA300 和 ST80-Ⅳ的成功传播与人类迁移的关系，并逐渐增加了对耐药性（*mecA*）和毒力因子如 Panton-Valentine 杀白细胞素（Panton-Valentine leukocidin，PVL）和 ACME 的摄取[46-48]。

CA-MRSA 更可能携带 PVL，这是一种具有强效细胞溶解及炎症活性的打孔毒素[49-50]。值得注意的是，PVL 的拥有权并不仅限于 CA-MRSA。许多流行的甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌（methicillin-susceptible *S. aureus*，MSSA）谱系的分离株可能携带 PVL 基因。据报道，特别是在非洲人群中，PVL 阳性的 MSSA 的患病率很高[24,51-53]。

USA300 定植和(或)感染的高危人群包括日托中心的儿童、运动员、新兵、囚犯和与男性发生性关系的男性,但是越来越多的文献报道了在最初高危人群外出现定植和感染的情况[54-55]。CA-MRSA 定植的健康人在具有的危险因素、地域及年龄方面有很大差异[56-57]。CA-MRSA 可引起浅表皮肤和软组织感染,很少与坏死性筋膜炎、肌炎、坏死性肺炎和其他严重疾病相关[55,58]。在呼吸道病毒感染(最常见的是流感)后,由 PVL 阳性的 MRSA 和 MSSA 引起的坏死性肺炎在年轻的其他方面健康的儿童中可能是一种致命性疾病[49]。但是,CA-MRSA 目前正在医院流行并且获得额外的耐药表型,因此,HA-MRSA 和 CA-MRSA 菌株之间的某些区别可能会消失[59-60]。

直到最近,直接或间接的人际传播是 MSSA 和 MRSA 的主要传播途径,但现在认为动物也是重要的宿主。宠物感染 MRSA 与人类似(即人感染动物,进而再回传至人)。与其相反,新发现的家畜相关 MRSA(LA-MRSA)和 MSSA 菌株,如 ST398,则是通过家畜(尤其是猪,也包括鸡、火鸡、马和肉牛)对人类构成真正的人畜共患风险[61]。LA-MRSA 在欧洲和亚洲尤为普遍,但在所有五大洲都有记录[62-63]。猪似乎是主要的宿主,但是 LA-MRSA 在很多动物中都有报道,包括鸡、肉牛、奶牛、绵羊和马[30,64]。大部分欧洲 LA-MRSA 菌株用 MLST 分型属于 CC398,用最流行的 *spa* 分型属于 t011 和 t034[65]。与此相反的是,许多亚洲国家中 LA-MRSA 的主流克隆谱系是 ST9[66]。在美洲,患病率似乎较低,已报道了 ST398 和 ST5[67]。PVL 及免疫逃逸簇的基因在 LA-MRSA 菌株中均为典型阴性。一般来说,LA-MRSA CC398 分离株可以引起金黄色葡萄球菌导致的所有类型感染,包括致命性疾病[68]。所观察到的不太严重的感染占优势,可能与大多数 CC398 携带者是具有完整免疫防御功能的年轻健康个体有关[健康工作者效应(healthy worker effect)][69]。LA-MRSA CC398 可能对除四环素类抗生素以外的抗生素表现为耐药,并且几乎所有的分离株中都发现了这种耐药性。但是到目前为止,与 HA-MRSA 分离株相比,LA-MRSA 分离株表现出这种特性的比例较低[30]。除农场工作人员外,MRSA 在普通人群中携带率仍然很低,即使在家畜中 LA-MRSA 比例很高的地区也是如此[10,70]。

已知金黄色葡萄球菌金黄色亚种可以在很多家养和野生动物中定植,有报道已经从绵羊的皮下脓肿中分离到金黄色葡萄球菌厌氧亚种[71]。到目前为止,人类临床标本中还没有分离到这个亚种。中间葡萄球菌、假中间葡萄球菌(2005 年划定)和海豚葡萄球菌的 2 个亚群是密切相关的凝固酶阳性葡萄球菌,通常从鸟类、食肉动物和其他哺乳动物(如马和猫)中分离。因为这些菌种之间非常难以区分,所以此前报道的中间葡萄球菌的变异型很有可能包括海豚葡萄球菌特别是假中间葡萄球菌。假中间葡萄球菌可能是从正常和感染的犬皮肤分离的主要的凝固酶阳性葡萄球菌[72]。凝固酶阳性的动物源性葡萄球菌包括施氏葡萄球菌凝聚亚种、猫葡萄球菌(*S. felis*)和水獭葡萄球菌。猪葡萄球菌分离自猪,艾格尼丝葡萄球菌分离自牛奶,这两者的凝固酶试验结果可变。然而,在动物(宠物或家畜)与其主人之间密切接触的情况下,可能会出现具有广泛宿主谱基因型的金黄色葡萄球菌在这些动物中的定植[73]。

2. 凝固酶阴性葡萄球菌 在人体,表皮葡萄球菌是最常见的体表定植的葡萄球菌,尤其在潮湿部位,如腋窝、腹股沟、会阴、鼻前庭、足趾。耳葡萄球菌是健康人外耳道微生物群的一部分,仅在该区域定植。青春期后,在前额和头皮的皮脂腺周围发现头葡萄球菌。溶血葡萄球菌和人葡萄球菌主要从大汗腺多的腋窝和耻骨区分离。腐生葡萄球菌腐生亚种主要定植在年轻女性的直肠和泌尿生殖道。路邓葡萄球菌常见于下肢和腹股沟处,但是偶尔也可以在身体的其他部位发现这些菌种。一些近期发现的葡萄球菌,如马赛葡萄球菌、佩滕科夫葡萄球菌和彼德拉斯葡萄球菌也可能是人类皮肤正常菌群的一部分。

松鼠葡萄球菌和木糖葡萄球菌是许多动物皮肤和黏膜的正常菌群,偶尔也在人体发现。两者均能在食物中分离。木糖葡萄球菌是一种主要用于肉类发酵的发酵剂之一。克氏葡萄球菌(*S. kloosii*)、马葡萄球菌马亚种(*S. equorum* subsp. *equorum*)和鸡葡萄球菌(*S. gallinarum*)在部分哺乳动物和食物中存在。产色葡萄球菌(*S. chromogenes*)和缓慢葡萄球菌可以从偶蹄类动物及其加工食品中分离得到。小牛葡萄球菌[同菌异名为普氏葡萄球菌(*S. pulvereri*)]易在马和鲸鱼中发现。哺乳动物和鸟类中可发现阿尔莱特葡萄球

菌(*S. arlettae*)。尼泊尔葡萄球菌(*S. nepalensis*)已经从喜马拉雅山羊中分离。蝇葡萄球菌(*S. muscae*)从苍蝇中分离。猪鼻葡萄球菌(*S. rostri*)从猪的鼻腔、德氏葡萄球菌(*S. devriesei*)从牛的乳房、田鼠葡萄球菌(*S. microti*)从自由生活的普通田鼠、斯德潘罗夫葡萄球菌从啮齿动物和食虫哺乳动物中分离得到。肉葡萄球菌肉亚种(*S. carnosus* subsp. *carnosus*)和有益亚种(*S. carnosus* subsp. *utilis*)、香料葡萄球菌、德氏葡萄球菌、马葡萄球菌涂散亚种(*S. equorum* subsp. *linens*)、弗氏葡萄球菌、鱼发酵葡萄球菌(*S. piscifermentans*)和琥珀葡萄球菌干酪亚种(*S. succinus* subsp. *casei*)与发酵食品和奶制品有关。从河底沉积物中分离到阿根葡萄球菌。琥珀葡萄球菌琥珀亚种(*S. succinus* subsp. *succinus*)可从琥珀碎片中分离。但是许多菌种完整和(或)真正的自然宿主目前尚不清楚。

(二) *Abyssicoccus*、*Aliicoccus*、*Corticicoccus*、酱球菌属、巨型球菌属、医院球菌属和盐水球菌属

巨型球菌属包括 8 种蹄类动物源性菌种,包括解酪巨型球菌(最初称为解酪葡萄球菌)。该菌种在香肠和肉制品等食品中发现。最近报道从犬的皮肤标本中分离到犬巨型球菌(*M. canis*)[74]。

到目前为止,唯一报道的马赛医院球菌(*Nosocomiicoccus massiliensis*)是从 HIV 感染的患者粪便标本中分离到的[75]。烧瓶医院球菌(*Nosocomiicoccus ampullae*)最初分离自用于清洗伤口的生理盐水瓶表面[76]。有关该菌种的最新报道包括从人尿标本中分离和在发酵大豆调味品中基于 16S rRNA 基因的检测。

从发酵的海鲜和咸鱼或从生理盐水和沙漠土壤、海洋沉积物、盐湖或盐矿中分离到了耐盐/嗜盐的 *Abyssicoccus*、*Aliicoccus*、酱球菌属和盐水球菌属。已经从杨树的树皮组织溃疡中发现了 *Corticicoccus*。

(三)微球菌科和皮生球菌科

临床标本中分离的大多数微球菌科和皮生球菌科的主要定植部位是人和其他哺乳动物的皮肤。大多数人(约 96%)携带有微球菌的皮肤菌群,其中藤黄微球菌是最常见的菌种,其次是变异库克菌。黏滑罗氏菌是口腔和上呼吸道的正常定植菌。动物和乳制品可能是微球菌第二大来源。最近发现的许多微球菌科和皮生球菌科细菌可在不同环境中定植。

(四)差异球菌属

耳炎差异球菌在健康人群的外耳道有很高的定植率,说明差异球菌属是正常菌群的一部分。

四、临床意义

(一)葡萄球菌属和其他葡萄球菌科细菌

许多葡萄球菌是皮肤和黏膜的机会致病菌,当创伤或侵入性医疗使皮肤黏膜屏障破坏后,某些菌种和菌株可成为病原菌。葡萄球菌分离株需要评估其临床意义以确定是污染菌、定植菌还是病原菌。

金黄色葡萄球菌可引起多种人类和动物疾病,因此是临床上最重要的菌株[77]。金黄色葡萄球菌有大量冗余和重叠的毒力因子,如黏附素、酶和毒素,并有多种策略可以逃避宿主的免疫反应。另外,该病原体还对现有的多种治疗药物产生耐药。美国国家医疗安全网数据显示,金黄色葡萄球菌是仅次于 CoNS 的第二大医疗保健相关感染病因,尤其是呼吸机相关肺炎和手术部位感染的最常见原因。在医院原发性菌血症的病因中,金黄色葡萄球菌仅次于 CoNS,列第二位[78-79]。

由金黄色葡萄球菌引起的疾病大致可以划分为毒素性疾病和化脓性感染,包括皮肤和软组织感染(skin and soft tissue infections,SSTIs)、无菌组织和内脏器官感染、全身性感染和异物相关感染(foreign-body-related infections,FBRIs)。SSTIs 是最常见的社区获得性金黄色葡萄球菌感染,包括由 CA-MRSA 引起的感染。SSTIs 疾病谱包括从浅部组织感染(脓疱病、毛囊炎、疖或痈、化脓性汗腺炎、脓皮病和伤口感染)到深部组织感染(脓肿、乳腺炎、蜂窝织炎和化脓性肌炎)再到急性危及生命的坏死性筋膜炎和肌炎。深部组织感染可能涉及身体任何部位和器官,可导致脓胸、骨髓炎、关节炎、心内膜炎、肺炎、中耳炎、鼻窦炎、乳突炎和腮腺炎。任何部位的金黄色葡萄球菌感染都可侵入血流,导致菌血症。全身性感染包括原发性和继发性菌血症、脑膜炎和心内膜炎。菌血症

可能由其他部位感染(如椎体骨髓炎)转移引起。先天性或获得性宿主免疫缺陷和异物的存在可能会导致严重感染。

除了急性侵袭性感染,金黄色葡萄球菌还可以引起慢性、持续性和复发性感染,这通常是由被称为小菌落变异型(small colony variants,SCVs)的表型亚群引起,其表现出细胞内持续存在的适应性表型[80]。正常和 SCVs 表型之间的转换似乎是双向的,分别适应细胞外和细胞内条件的高度动态过程。准确检测表型转换给常规实验室提出了挑战(见下文)[81-82]。金黄色葡萄球菌的 SCVs 和其他葡萄球菌(如表皮葡萄球菌和路邓葡萄球菌)已从慢性骨髓炎、脓肿、FBRIs 及伴有慢性气道感染的囊性纤维化患者中分离到[83]。

由金黄色葡萄球菌引起的经典的毒素介导的疾病包括葡萄球菌中毒性休克综合征(toxic shock syndrome,TSS)、葡萄球菌引起的食物中毒、大疱性脓疱病及其广义形式如葡萄球菌烫伤样皮肤综合征(staphylococcal scalded skin syndrome,SSSS)。TSS 与葡萄球菌的定植或感染相关,该葡萄球菌通常 TSS 毒素-1(TSS toxin 1,TSST-1)阳性,或在少见情况下,其他葡萄球菌致热毒素超抗原(pyrogenic toxin superantigen,PTSAg)(主要是葡萄球菌肠毒素 B 或 C 家族)阳性。基于临床表现来诊断 TSS,其特点是高热、快速发作的低血压、弥漫性的红斑皮疹、脱屑多发生在发病 1～2 周后、累及 3 个或 3 个以上的器官系统。该症状最初报道均为儿童,后发现也与女性月经期使用高吸收性卫生棉条有关。后由于卫生棉条的吸收性和化学成分改进,月经期 TSS 发病率降低,而 20 世纪 80 年代后,非月经 TSS 发病率一直不变[84]。尽管通常无法确定感染源,但非月经 TSS 通常与手术部位感染或软组织感染有关。

葡萄球菌引起的食物中毒是由食入一种或多种被相对耐热肠毒素污染的食品引起。食物摄入后 2～6 h 出现恶心、呕吐、腹部绞痛、腹泻等症状,尽管症状可能很严重,但通常会在 8～12 h 后消退。

大疱性脓疱病和 SSSS 是由表皮剥脱(exfoliative)[表皮溶解性(epidermolytic)]毒素 A 和 B 引起。SSSS 通常发生在新生儿和幼儿[85]。除了全身 90%或更多的皮肤严重剥落(Ritter 病)外,还包括局部形成水疱的新生儿天疱疮。诊断以临床特征为基础,包括尼氏征(Nikolsky 征),即皮肤因剥脱而在轻柔的压力下产生皱褶。

与金黄色葡萄球菌相比,已发现其姊妹种银色葡萄球菌的毒力降低[86]。但是,银色葡萄球菌在发病率、皮肤和软组织感染,以及包括骨和关节感染、肺炎和菌血症在内的侵袭性感染的发生率均相当[87-89]。*S. schweitzeri* 是金黄色葡萄球菌复合群中的另一姊妹种,从猴子到人类的传播可能非常罕见。已经报道了从人类身上的一些分离株,但迄今为止没有感染病例[90-91]。

其他非金黄色葡萄球菌的凝固酶阳性或可变的葡萄球菌是各种动物皮肤的正常菌群,偶尔可导致宿主及与动物接触的人类感染。中间葡萄球菌、假中间葡萄球菌、海豚葡萄球菌是犬脓皮病最常见的病原菌。猪葡萄球菌主要引起猪的渗出性表皮炎(猪油皮病),施氏葡萄球菌凝聚亚种引起狗的外耳炎,金黄色葡萄球菌厌氧亚种引起脓肿——一种绵羊和山羊的特殊淋巴结炎。中间葡萄球菌、假中间葡萄球菌偶尔可引起免疫功能低下患者由犬造成的伤口感染、FBRIs、食物中毒和侵袭性感染。已知施氏葡萄球菌凝聚亚种和猪葡萄球菌可引起少数人群感染。艾格尼丝葡萄球菌可从牛乳房内感染灶中分离。

自 20 世纪 80 年代以来,逐步认识到 CoNS 尤其是表皮葡萄球菌和溶血葡萄球菌[92]是医疗保健相关病原菌(health care-associated pathogens)。这 2 个菌种通常被称为"中等致病性"("medium-pathogenicity")葡萄球菌,因为它们主要在有诱发因素,如免疫缺陷和(或)存在留置或植入异物的患者中引起医疗保健相关感染[79,93]。此外,路邓葡萄球菌和腐生葡萄球菌也可归类到该组(单独介绍)。CoNS 很少引起正常组织的感染。总的来说,CoNS 引起的临床感染特征是轻微的(与亚急性或慢性相关,没有暴发迹象),很少危及生命。CoNS 是阳性血培养分离到的最常见的微生物群,但成人中只有不到 1/10 在临床上有意义[94]。CoNS 引起医疗保健相关血流感染通常与插入中心或外周静脉导管相关[78]。FBRIs 最重要的发病机制是 CoNS 能够定植在装置表面形成厚的多层生物膜[95]。表皮葡萄球菌是假体血管移植物、骨科假体设备和脑脊液分流术相关感染的主要病原菌。CoNS 是人工瓣膜心内膜炎病原体,很少(约 5%)参与(先前受损的)自体瓣膜感染[96]。

静脉吸毒者可发生右侧自体瓣膜心内膜炎。实际上，CoNS几乎可以感染任何手术植入材料和装置[97]。CoNS在早产儿中易发生侵袭性感染。在该患者组中，CoNS是早发和晚发血流感染最常见的病原菌[98-99]。

在所有的CoNS中，路邓葡萄球菌具有特殊的地位。因为它的感染一般类似于金黄色葡萄球菌而不是其他CoNS引起的感染[92]。近年来，该菌种已成为皮肤脓肿和伤口感染，尤其是在腰部以下感染中相对常见的病原菌，实验室应该对此引起重视[100]。尽管如此，路邓葡萄球菌除引起人工瓣膜心内膜炎外，也因为会引起异常的暴发性自体瓣膜心内膜炎而闻名[101]。因此，对路邓葡萄球菌菌血症患者应仔细检查是否有心内膜炎的体征[102]。除了引起其他侵袭性感染外，该菌还是FBRIs的常见病原菌。

由于特殊的尿道结构和生态特征，腐生葡萄球菌腐生亚种是年轻健康、性活跃女性急性、复发性尿路感染的常见病原菌，很少引起年轻男性或男孩感染。这种病原菌是年轻女性非复杂性膀胱炎的第二大病原菌(仅次于大肠埃希菌)(译者注：此为美国的流行病学特征，腐生葡萄球菌在中国并无如此高的分离率)。2次或2次以上的中段尿培养菌落数≥100 000 CFU/ml时，通常说明是有临床意义的菌尿。在有症状的患者中低菌落计数可能也有意义。最近发现的腐生葡萄球菌牛亚种(*S. saprophyticus* subsp. *bovis*)尚未见到引起感染的报道。

已有病例报告和系列报道其他各种CoNS(头葡萄球菌、产色葡萄球菌、科氏葡萄球菌、人葡萄球菌、巴斯德葡萄球菌、佩滕科夫葡萄球菌、沃氏葡萄球菌和木糖葡萄球菌)是引起FBRIs的病原菌。相反，在食品中肉葡萄球菌、香料葡萄球菌、鱼发酵葡萄球菌、马葡萄球菌涂散亚种和其他葡萄球菌认为是非致病葡萄球菌。

由于尚未有人类感染*Abyssicoccus*、*Aliicoccus*、*Corticicoccus*、酱球菌属、巨型球菌属、医院球菌属和盐水球菌属的报道，本章节对这些菌属将不再做进一步讨论。

(二)微球菌科和皮生球菌科

虽然微球菌通常被认为是无害的腐生菌，但它们也可成为机会致病菌。微球菌属、库克菌属和皮肤球菌属主要在免疫功能低下的患者中引起感染，如心内膜炎、肺炎、脓毒症或FBRIs[103]。但是，最近发现的微球菌科和皮生球菌科细菌属环境细菌，如嗜根库克菌(*Kocuria rhizophila*)、*Kocuria marina*和*Dermacoccus barathri*，应该评估其临床意义[104-106]。从外耳道炎患者的耳拭子中培养出怠惰耳炎杆菌(*Auritidibacter ignavus*)，但是其作为病原菌的作用尚未阐明[107]。

黏滑罗氏菌一直认为是导致菌血症、心内膜炎、眼内炎、血管内导管相关性感染和中枢神经系统感染、肺炎、腹膜炎、败血症和颈部坏死性筋膜炎的病原菌[108]。

由于尚未有人类感染微球菌科和皮生球菌科其他菌属的报道，本章不再进一步讨论。

(三)差异球菌属

耳炎差异球菌与中耳感染有关，但它在中耳炎发病机制中的作用尚存在争议[109-110]。一些个案报道已描述了其他病例，如心内膜炎和眼内炎，其中某些继发于慢性中耳炎[111]。

五、标本的采集、运输和储存

本书第19章给出的标本采集、运输和储存的一般原则适用于本章列出的微生物。这些菌种通常不需要特殊的方法或预防措施，因为它们很容易从大多数临床感染部位的标本中分离到，并且相对耐干燥和温和的温度变化。虽然一些葡萄球菌可能需要厌氧条件或补充CO_2才能获得满意的生长，但它们可以在空气中运输及在有限时间内储存。

六、直接检测

(一)显微镜检查

通常无菌体液如脑脊液和关节抽吸物直接显微镜检查可能对检测有帮助。对非无菌体液显微镜检查可能也是有用的，但必须考虑炎症细胞与上皮细胞的相对关系。

本章讨论的微生物是革兰阳性、无动力、无芽胞的球菌，大多成对或四联排列，但也可能以单个、不规则(葡萄状)簇状或短链(3个或4个细胞)

状排列。然而，在微球菌科和皮生球菌科中一些菌种呈杆状，有动力。直接显微镜检查阳性发现可报告为“类似葡萄球菌的革兰阳性球菌”。

(二)核酸检测

为了从监测拭子中检测 MRSA，现已引入基于直接扩增的方法。为了快速进行 MRSA 筛查，已开发出 2 种主要方法：①多位点检测甲氧西林耐药编码基因 *mecA* 和 *mecC*，以及其他金黄色葡萄球菌特异靶位(见下文的“核酸分析为基础的菌种鉴定”)；②单位点检测葡萄球菌染色体 *mec* 基因盒(staphylococcal cassette chromosome，SCC*mec*)的 3′末端和邻近金黄色葡萄球菌染色体 5′*orfX* 区域，后一种方法仅用一对引物就可同时扩增耐药标志物和种特异性标志物[112]。

多位点检测方法可能会受样本中 MSSA 和耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(methicillin-resistant CoNS，MR-CoNS)共存的影响，从而导致 MRSA 假阳性[113]。这种方法的根本优势在于直接检测编码甲氧西林耐药的 *mecA* 基因，如果另有针对性，也可检测 *mecA* 的同系物 *mecC*。应用这一原理的试剂盒如 eazyplex MRSA(AmplexDiagnostics，Gars-Bahnhof，Germany)，the BD MAX StaphSR test (BD Diagnostics，Sparks，MD)，Xpert SA Nasal Complete(Cepheid，Sunnyvale，CA)，MRSA/SA ELITe MGB(ELITechGroup，Logan UT)，the RIDA Gene MRSA system(R-Biopharm，Darmstadt，Germany)和 cobas MRSA/SA test(Roche，Basel，Switzerland)已经商品化，所有这些试剂盒的新一代产品都可检测 *mecC*[114]。这些试剂中的一部分产品结合了多位点检测方法和单位点扩增策略(见下文)。

单位点检测方法克服了筛查样本中 MSSA/MR-CoNS 共存的影响。这一原理是多种快速检测系统的基础，例如，the BD Max MRSA XT assay [BD，Franklin Lakes，NJ]，GenoType MRSA Direct，GenoQuick MRSA 和 FluoroType MRSA [Hain Lifescience]，Xpert MRSA NxG [Cepheid]，the LightCycler MRSA advanced test [Roche]。然而，SCC*mec* 作为标志物替代直接检测 *mecA* 基因可能导致假阴性结果，这是因为 SCC*mec* 基因引物结合位点高度可变性，尤其在罕见的或还未知的 SCC*mec*(亚)型基因情况下尤为凸显。另一方面，出现假阳性结果可能由于 *mecA* 基因被基因盒内的其他基因(如耐药基因或编码荚膜基因)替换，特别是基因盒的部分敲除，导致剩余部分缺乏 *mec* 基因复合物但仍包含 SCC 基因盒 3′末端的引物结合位点(“dropout” isolates)[115-116]。

总的来说，这些快速筛查 MRSA 的扩增方法，其特点是阴性预测值高(97%～99%)，而阳性预测值一般(65%～95%)，所以阻碍其用于鉴定 MRSA 和 MSSA 感染。到目前为止，MRSA 培养对于确认分子检测的结果、分型和确定完整的药敏谱都是必不可少的。

对于用 PCR 扩增的方法来检测金黄色葡萄球菌(包括 MRSA)引起的皮肤和软组织感染，Xpert MRSA/SA SSTI(Cepheid) test 已经商品化。

七、分离程序

葡萄球菌和微球菌广泛分布在皮肤和黏膜，从可能的感染部位分离病原菌应小心避免采集部位周围微生物群的影响。应遵循本书第 19 章和第 21 章描述的基本培养和分离程序。在本节中，将讨论 MRSA 培养的一些方面。

从临床标本分离葡萄球菌的主要培养平板是含 5%脱纤维绵羊(或马)血的哥伦比亚平板或胰酶大豆血琼脂平板(第 21 章)。大多数葡萄球菌在培养 18～24 h 内大量生长，同时使用增菌肉汤(如葡萄糖肉汤)培养 24 h 和 48 h 后在哥伦比亚血琼脂上划线接种可提高金黄色葡萄球菌和其他葡萄球菌的分离率。

金黄色葡萄球菌选择性琼脂，如甘露醇盐琼脂、含卵黄-亚碲酸盐丙酮酸的 Baird-Parker 平板、哥伦比亚多黏菌素-萘啶酸平板、脂肪酶-盐-甘露醇琼脂(Remel、Lenexa、KS)和苯乙醇平板，适用于严重污染来源的标本，如粪便和囊性纤维化患者的呼吸道培养标本。对这些平板上分离的假定是金黄色葡萄球菌的菌种都必须经过确认。

各种针对金黄色葡萄球菌特异的酶底物显色选择性琼脂，如 CHROMagar Staph aureus (CHROMagar，Paris，France)、BBL CHROMagar-Staph aureus(BD Diagnostics，Sparks，MD)、BrillianceStaph 24 (ThermoFisher Scientific Oxoid，

Waltham, MA）和 CHROMID S. aureus Elite（bioMérieux, La Balme-Les-Grottes, France），根据菌落颜色判读的显色培养基已经商品化。特别是对筛选目的，显色培养基已被证明有适当的敏感性和特异性，可用于推测但不能作为最终的鉴定结果。

基于培养的 MRSA 筛查检测定植（优选鼻腔，咽部标本亦可），过去广泛使用选择性培养基（如甘露醇盐琼脂）添加苯唑西林或最好为头孢西丁。含显色酶底物的培养基具有较好的特异性，但是建议对部分产品进行菌种鉴定的确认。准确遵守最短培养时间对显色培养基检测 MRSA 的敏感性起决定性作用，特别是对那些培养时间较短的培养基。用肉汤增菌后再在平板上培养可以提高敏感性，但会延迟报告结果。ThermoFisher-ScientifcOxoid 可提供商品化的 MRSA 筛选肉汤（Contrast MRSA broth）。

诊断 CoNS 和其他菌株引起的导管相关血流感染仍然面临重大的挑战。最常用的诊断技术是导管滚动半定量培养。具体做法是将中心静脉导管远端部分剪下，然后在哥伦比亚血琼脂板表面来回滚动至少 4 次，孵育过夜。菌落计数≥15 CFU 提示导管已被定植。一些研究认为采用定量超声技术同时检测导管腔内和腔外细菌具有更高的敏感性[117]。然而，另一些研究未能表明超声处理比导管滚动半定量法优越[118]。同时分别从导管和外周静脉处采血进行配对定量血培养，根据阳性报警时间差来进行分析，这是不需要立即拔除导管的方法的一个例子（参见下文的"结果的评价、解释和报告"）。

培养微球菌和黏滑罗氏菌应该和葡萄球菌一样使用哥伦比亚血琼脂，在有氧、35～37℃条件下孵育。然而，微球菌科和皮生球菌科需要孵育 36～48 h 菌落才能生长良好。

由于耳炎差异球菌的生长速率低，常规非选择性培养方法很难分离该菌。含 6%氯化钠的血琼脂平板可提高分离率。

八、鉴定

区分触酶阳性的革兰阳性球菌及其相关菌属，以及其他微生物群的基本标准见上述"微生物特征"部分及表 22-3。

在过去几年中，基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）在很大程度上取代了生化鉴定程序（请参见本手册之前版本中的详细信息），并已成为许多临床微生物学实验室用于快速及特异鉴定葡萄球菌和其他触酶阳性球菌的常规方法。针对菌种特定序列的核酸分子方法或基于 DNA 测序的方法可增强对模棱两可结果的鉴定能力。

（一）葡萄球菌属及相关菌属

商品化的鉴定系统已经替代了最初应用广泛的、由 Kloos 和 Schleifer 在 1975 年发表的葡萄球菌生化和其他关键生理学特征的鉴定表[119]，而最近 MALDI-TOF MS 又取代了前者。

1. 菌落形态　大多数葡萄球菌在空气中 34～37℃培养 24 h 形成直径 1～3 mm 的菌落，72 h 后形成直径 3～8 mm 的菌落。而金黄色葡萄球菌厌氧亚种、解糖葡萄球菌、耳葡萄球菌、马葡萄球菌、小牛葡萄球菌和缓慢葡萄球菌生长缓慢，通常需要 24～36 h 才能有可见菌落。进一步培养到 48～72 h（最佳方案是继续室温孵育两天）可以提高形态学差异。

在常规血琼脂平板上生长的典型金黄色葡萄球菌为产生色素（灰色、灰白色、淡黄色、黄色、橙色）、光滑、完整、略微凸起有溶血的菌落（图 22-1）。高度荚膜化的菌株形成的黏液型菌落是罕见的。一些金黄色葡萄球菌及 CoNS（如溶血葡萄球菌和路邓葡萄球菌）菌落周围可能有一个模糊或明显的 β 溶血区，溶血强度可从弱到强。金黄色葡萄球菌或其他葡萄球菌的 SCVs 菌株特征是针尖样菌落（菌落大小仅接近于野生株的 1/10），大多数继续孵育 24～72 h 形成无色和无溶血菌落（图 22-1）[80,83]。SCVs 往往夹杂在正常的表型菌株中，从而出现混合生长现象。次代培养时 SCVs 能保持稳定或回归野生型。由于 SCVs 存在营养缺陷，在血红素、维生素 K，或胸苷和（或）二氧化碳环境下能恢复正常生长[80]。

典型的 CoNS 菌落为无色、光滑、完整的、闪光、不透明。黏液样菌落罕见。孵育 3 天菌落直径可达到 3～6 mm。产色葡萄球菌、德氏葡萄球菌、路邓葡萄球菌、松鼠葡萄球菌、小牛葡萄球菌、沃氏葡萄球菌和木糖葡萄球菌菌落或多或少有规律地呈灰黄色、黄色、黄橙色。其他 CoNS 通常可

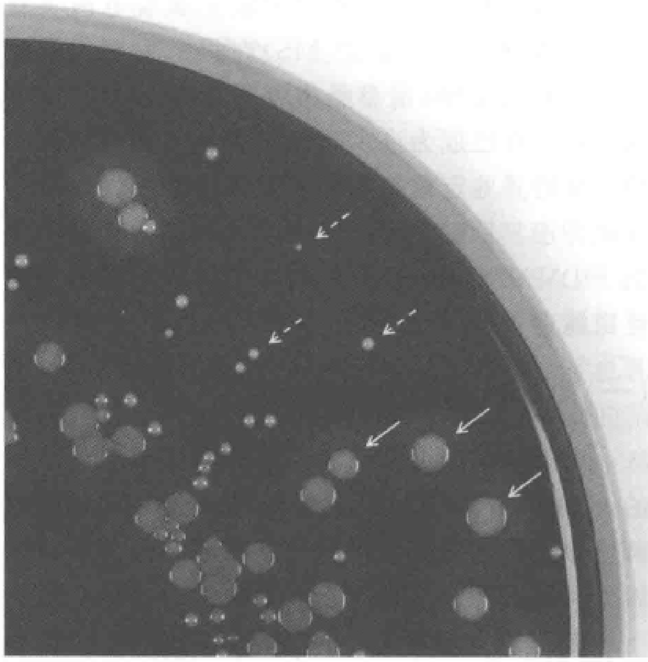


图 22-1 金黄色葡萄球菌金黄色亚种在含 5%绵羊血的哥伦比亚血琼脂板孵育 24 h 菌落形态。正常的菌落是浅灰色的，周围有淡黄色的溶血区域（箭头）。小菌落 SCVs 特点是小、无溶血、无色素菌落（虚线箭头），见彩插

产生淡黄色色素。

2. 凝固酶产生和凝集因子检测 血浆凝固酶试验是一种临床实验室广泛用于金黄色葡萄球菌鉴别的试验，有以下 2 个不同的方法。①试管法凝固酶试验，检测细胞外游离的凝固酶（葡萄球菌凝固酶），基于葡萄球菌凝固酶能使纤维蛋白原转变成纤维蛋白；②玻片法凝固酶试验，检测所谓的"细胞壁结合的凝固酶"（即凝集因子）。在 MALDI-TOF MS 结果不明确或在 MALDI-TOF MS 不可用的情况下，这 2 种方法可能仍然有用。

将菌落挑入兔血浆中进行试管法凝固酶试验。将试管在 37℃孵育 4 h 至关重要。任何程度的凝块均表示试验阳性。絮状或纤维状沉淀并不是真正的凝块，应该判为阴性。如果 4 h 没有形成凝块，应该于 37℃继续孵育 18 h 后再观察。如果检测的是 SCVs 可能会有假阴性结果，原因可能是由于某些菌株产生的葡激酶，使形成的凝块溶解。从人类标本中分离的葡萄球菌进行游离凝固酶检测通常等同于金黄色葡萄球菌的菌种鉴定。但是在兽医微生物学实验室和从动物造成的人类伤口标本中，应考虑到非金黄色葡萄球菌的凝固酶阳性或可变的菌种（表 22-4）。

为了克服传统的玻片法凝集试验低敏感性、低特异性和试管法凝固酶的孵育时间长的缺点，已经开发了用于金黄色葡萄球菌推测鉴定的快速乳胶和血凝试验。第三代检测包括蛋白 A、凝集因子 A 及荚膜多糖 5 型和 8 型。它们表现为较高的敏感性（98%～100%），但是特异性相对较低（72%～99%）。假阳性反应发生在一些有 8 型荚膜多糖（溶血葡萄球菌和人葡萄球菌）或细胞壁血凝素（腐生葡萄球菌）的 CoNS 菌株。

对于这 2 种方法，本手册以前的版本提供了更多的细节。

3. 药物敏感性和生化反应鉴定菌株 腐生葡萄球菌和其他一些 CoNS 菌株对新生霉素天然耐药，但在"表皮葡萄球菌群"（表 22-4）里临床重要的 CoNS 中并不常见。多黏菌素 B 耐药通常见于金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、猪葡萄球菌、产色葡萄球菌，较少见于一些路邓葡萄球菌菌株。有关方法学的详细信息，请参阅本手册以前的版本。

为了快速、标准化、降低成本和使用方便，各种底物的发酵、氧化、降解及水解的经典试验（详见第 20 章和第 21 章）已经纳入商品化的手工和自动生化检测系统（见下文、表 22-4 及第 5 章）。利用高级专家系统进行的抗菌敏感性试验和实验室信息学软件接口程序同时对商品化检测系统作补充。由于快速生化鉴定系统使用了替代的指示剂，故与传统的测试结果（请参见本手册以前的版本）可能略有不同。商品化鉴定系统鉴定临床重要的葡萄球菌（和其他一些需氧革兰阳性球菌）的准确性达 70%～90%或以上。对于某些鉴定系统，结果可靠性取决于是否按照制造商的建议进行附加试验。不常见的菌株或表型变异菌株（如 SCVs）由于生化反应模式改变而需要分子生物学鉴定。

大多数系统可以成功区分金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和腐生葡萄球菌之间的差异。而准确鉴定不常见菌种时，各个鉴定系统各有不同。一般鉴定系统可能对常见的葡萄球菌鉴定失败，特别是对表型变异或从牲畜和食品中分离的菌株。推荐对推定的金黄色葡萄球菌，尤其是苯唑西林耐药菌株用第二种独立的方法进行鉴定结果的验证。对于鉴定结果有疑问、其临床意义影响患者诊疗的菌株，应该做附加试验加以确证。本手册以前的版本提供了特定的商品化鉴定系统的更多详细信息。

4. 核酸分析为基础的菌种鉴定 由于革兰阳性葡萄球菌的特殊结构需要溶解细胞壁，所以提取葡萄球菌核酸可能具有挑战性。为此一直使用溶葡萄球菌素、溶菌酶、蛋白酶K和无色肽酶进行破壁溶菌。

可以使用基于DNA序列多态性的PCR指纹识别技术，通用基因的种特异的可变区或金黄色葡萄球菌（或其他葡萄球菌）的独特基因可以用于鉴定和区分葡萄球菌分离株。已经发表了关于特异性扩增16S和23 SrRNA通用基因片段和间隔序列的文章[120-122]。其他鉴定葡萄球菌的通用DNA靶标包括编码RNA聚合酶B(*rpoB*)、延长因子(*tuf*)、旋转酶(*gyrA*)、锰依赖性超氧化物歧化酶(*sodA*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(*gap*)、细胞色素d对苯二酚氧化酶亚单位Ⅱ(cytochrome d ubiquinol oxidase subunit Ⅱ, *cydB*)（译者注：此处基因名称在不同文献中有差异）和60 kDa热休克蛋白(HSP60或GroE)[123-127]。

WGS和选择通用的系统标志物基因进行测序代表了鉴定已知与未知葡萄球菌菌种的最终方法。16S rRNA基因测序区间在70～300 bp、420～500 bp、1000～1050 bp和1250～1290 bp（对应大肠埃希菌16S rRNA基因的核苷酸）有助于判定葡萄球菌菌种间序列差异。值得注意的是，新近描述的银色葡萄球菌不能通过16S rRNA基因测序和金黄色葡萄球菌区分开，此外*S. schweitzeri*仅与金黄色葡萄球菌存在1 bp的碱基差异[5]。葡萄球菌亚种鉴定时，*rpoB*部分基因测序似乎比16S rRNA部分基因测序更显优越性[126]。目前应用于葡萄球菌分离株测序的公共序列数据库也存在公认的局限性[120]。

对于单个的葡萄球菌菌种，已经对特定的靶基因进行了评估。最受关注并广泛研究的鉴定金黄色葡萄球菌的*nuc*基因，它编码耐热核酸酶(thermonuclease或TNase)[128-129]。金黄色葡萄球菌复合群中两个最近界定的菌株在比对*nuc*基因时都显示出错配，尤其是在将*S. schweitzeri*序列与nuc_M基因进行比对后[5,91]。尽管在PCR引物退火位置上存在一些错配，但Brakstad等[128]报道的*nuc* PCR方法可以检测到银色葡萄球菌，而该引物在检测*S. schweitzeri*时不能产生扩增产物[91]。对中间葡萄球菌*nuc*基因的特定PCR方法也有报道[130]。用于鉴定金黄色葡萄球菌的其他特定靶标包括编码细胞外黏附蛋白(Eap)(*eap*)，凝集因子(*clfA*)，凝固酶(*coa*)，锰依赖性超氧化物歧化酶(*sodM*，CoNS中缺乏该酶)的基因、表达甲氧西林耐药必不可少的因素(*femA*和*femB*)，以及葡萄球菌插入元件IS431（仅针对MRSA）[131-135]。由于存在*fem*阴性的金黄色葡萄球菌和与*femA*基因结构相关的CoNS，故使用*fem*基因时可能导致错误鉴定结果。对于腐生葡萄球菌，已经引入了热休克阻遏蛋白的编码基因*hrcA*用于对该菌种的特异性检测[136]。发现的其他菌种特异性靶标还包括表皮葡萄球菌(*atlE*，编码自溶素E)、溶血葡萄球菌(*mvaA*，编码HMG-CoA还原酶)和人葡萄球菌(*gap*，编码3-磷酸甘油醛脱氢酶)[137]。

一些商品化用于金黄色葡萄球菌和其他葡萄球菌培养分离株的分子生物学鉴定方法[如GenoType Staphylococcus和GenoType MRSA(Hain Lifescience, Nehren, Germany)和the AccuProbe *Staphylococcus aureus* culture identification test (Hologic, Marlborough, MA)]已经问世。部分产品还可以检测耐药基因。Xpert MRSA/SA BC (Cepheid)和BD GeneOhm StaphSR test(BD Diagnostics)可直接从血培养阳性标本中检测MSSA和MRSA。其他产品，如BioFire FilmArray blood culture identification assay(BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT)和Verigene Gram-positive blood culture assay (Luminex, Austin, TX)，可以直接从血培养阳性瓶中鉴别包括MSSA和MRSA在内的更为广泛的细菌。目前已经设计出应用DNA寡核苷酸微阵列靶向特定葡萄球菌相关菌种及主要耐药基因和毒素相关基因的方法，并成功用于临床分离株的鉴定，表明该方法在基于微阵列的高通量筛选的潜力[138-139]。

利用荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)在血培养、脑脊液和组织（如心脏瓣膜）中快速检测葡萄球菌的属和种特异性探针已有成品问世[140-142]。*S. aureus*/CNS PNA FISH和更快的Staphylococcus QuickFISH(AdvanDx-OpGen, Woburn, MA)是利用肽核酸(PNA)FISH原理针对rRNA序列的商品化定性核酸杂交分析。这些试验可用于血培养阳性标本血涂片中金黄色葡萄球菌和一些CoNS的快速鉴定，并可与*mecA* XpressFISH(AdvanDx-OpGen)结合用于MRSA检测[143]。

RiboPrinter 微生物鉴定系统（Hygiena，Camarillo，CA）利用核糖体型模式分析（ribotype pattern analysis）来区分数据库中葡萄球菌菌种的不同模式。

5. 谱图技术鉴定菌株 在过去几年里，基于商品化质谱仪［Microflex LT/SH 和 LT/SH "smart"（Bruker Daltonics，Billerica，MA）及 VITEK MS（bioMérieux）］的 MALDI-TOF MS 已成为鉴定人类标本中分离的葡萄球菌的常规方法[144-148]。

大多数研究认为超过 97%的葡萄球菌可以鉴定到种水平，但是 CoNS 的鉴定率总体较低[146,149-151]。在一项由分子生物学明确鉴定的大样本临床菌株研究中，MALDI-TOF MS 方法（基于 MicroflexLT；Biotyper 2.0 的鉴定）鉴定金黄色葡萄球菌和 CoNS 时与作为参考方法的分子鉴定等效，但前者更快且与纳入研究菌株的甲氧西林耐药性无关[147]。然而，对于非人类相关和（或）新的 CoNS 菌种，扩增补充 MALDI-TOF MS 体外诊断数据库（IVD）是必需的[146]。例如，从水牛牛奶中分离的艾格尼丝葡萄球菌会被错误鉴定为猪葡萄球菌[127]。此外，可变结果甚至是低鉴定值结果也有报道，如阿尔莱特葡萄球菌、山羊葡萄球菌、肉葡萄球菌、产色葡萄球菌、科氏葡萄球菌、香料葡萄球菌、马葡萄球菌、尼泊尔葡萄球菌、腐生葡萄球菌、松鼠葡萄球菌和木糖葡萄球菌[127,152-153]。数据库中仍缺少其他葡萄球菌菌种（表 22-6）。特别是对金黄色葡萄球菌复合群的鉴定，如有必要，需要修改数据库条目[5,154]。将菌种水平的界值从 2.000 降低到≥1.700（Microflex LT）或者进行重复试验可以提高 CoNS 在菌种水平的鉴定率[153,155]。血培养报阳后将细菌转种在固体培养基上进行非常短时间的孵育后用 MALDI-TOF MS 可以对菌种做非常早期和可靠的鉴定[156]。乙醇-甲酸蛋白提取法成功鉴定金黄色葡萄球菌和 CoNS 的平均培养时间分别为 2.1 h 和 3.9 h[157]。如果用显色培养基 CHROMagar MRSA（CHROMagar，Paris，France）上的菌落测试可能比选非选择培养基上菌落测试的鉴定分值低，但这对鉴定没有相关的影响[158]。

表 22-6 MALDI-TOF MS 鉴定的葡萄球菌科

微生物	包含由制造商提供的数据库和修改后的数据库[a]（参考）	
	MALDI Biotyper 2.0[b]（Bruker Daltonik）	Advanced Spectra Classifier[c]（bioMérieux）
葡萄球菌属		
艾格尼丝葡萄球菌	NA	NA
阿根葡萄球菌	NA	NA
阿尔莱特葡萄球菌	IVD	IVD
金黄色葡萄球菌复合群		
金黄色葡萄球菌厌氧亚种	NA	NA
金黄色葡萄球菌金黄色亚种	IVD[d]，FDA[5]	IVD[e]，FDA[d]
银色葡萄球菌	[5]	NA
S. schweitzeri	[5]	NA
耳葡萄球菌	IVD，FDA	IVD
头葡萄球菌头亚种	IVD[d]，FDA[d]	IVD[e]，FDA[d]
头葡萄球菌解脲亚种	NA	IVD[e]
山羊葡萄球菌	IVD，FDA	IVD
肉葡萄球菌肉亚种	IVD[d]，FDA[d]	IVD[e]
肉葡萄球菌有益亚种	NA	IVD[e]
产色葡萄球菌	IVD，FDA-N	IVD
科氏葡萄球菌科氏亚种	IVD[d]，FDA[d]	IVD，FDA
科氏葡萄球菌解脲亚种	NA	IVD，FDA
香料葡萄球菌	IVD	NA
海豚葡萄球菌	IVD，FDA[154]	IVD
德氏葡萄球菌	NA	NA

（续　表）

微生物	包含由制造商提供的数据库和修改后的数据库[a]（参考）	
	MALDI Biotyper 2.0[b]（Bruker Daltonik）	Advanced Spectra Classifier[c]（bioMérieux）
"*S. edaphicus*"	[4]	NA
表皮葡萄球菌	IVD，FDA	IVD，FDA
马葡萄球菌马亚种	IVD[d]，FDA[d]	IVD[e]
马葡萄球菌涂散亚种	NA	IVD[e]
猫葡萄球菌	IVD，FDA	IVD
弗氏葡萄球菌	IVD	NA
鸡葡萄球菌	IVD，FDA-N	IVD
溶血葡萄球菌	IVD，FDA	IVD，FDA
人葡萄球菌人亚种	IVD[d]，FDA[d]	IVD[e]，FDA[d]
人葡萄球菌耐新生霉素败血亚种	NA	IVD[e]
猪葡萄球菌	IVD，FDA-N	IVD
中间葡萄球菌	IVD[d]，FDA[d][154]	IVD[f]
克氏葡萄球菌	IVD，FDA-N	IVD
缓慢葡萄球菌	IVD，FDA	IVD
路邓葡萄球菌	IVD，FDA	IVD，FDA
水獭葡萄球菌	IVD，FDA-N	IVD
马赛葡萄球菌	NA	NA
田鼠葡萄球菌	IVD	NA
蝇葡萄球菌	IVD，FDA-N	NA
尼泊尔葡萄球菌	IVD，FDA-N	NA
巴斯德葡萄球菌	IVD，FDA	IVD
S. petrasii subsp. *croceilyticus*	NA	NA
S. petrasii subsp. *jettensis*	NA	NA
彼德拉斯葡萄球菌彼德拉斯亚种	NA	NA
S. petrasii subsp. *pragensis*	NA	NA
佩滕科夫葡萄球菌	IVD，FDA	IVD
鱼发酵葡萄球菌	IVD，FDA-N	IVD
假中间葡萄球菌	IVD，FDA[154]	IVD[f]
猪鼻葡萄球菌	NA	NA
解糖葡萄球菌	IVD，FDA	IVD
腐生葡萄球菌牛亚种	NA	IVD[e]
腐生葡萄球菌腐生亚种	IVD[d]，FDA[d]	IVD[e]，FDA[d]
施氏葡萄球菌凝聚亚种	NA	IVD[e]
施氏葡萄球菌施氏亚种	IVD[d]，FDA[d]	IVD[e]，FDA[d]
松鼠葡萄球菌肉亚种	NA	IVD[e]
松鼠葡萄球菌啮齿亚种	NA	IVD[e]
松鼠葡萄球菌松鼠亚种	IVD[d]，FDA[d]	IVD[e]，FDA[d]
猿葡萄球菌	IVD，FDA-N	NA
猴葡萄球菌	IVD，FDA	IVD，FDA
斯德潘罗夫葡萄球菌	NA	NA
琥珀葡萄球菌干酪亚种	NA	NA
琥珀葡萄球菌琥珀亚种	IVD[d]，FDA-N[d]	NA
小牛葡萄球菌	IVD，FDA	IVD
沃氏葡萄球菌	IVD，FDA	IVD，FDA
木糖葡萄球菌	IVD[d]，FDA[d]	IVD

（续 表）

微生物	包含由制造商提供的数据库和修改后的数据库[a]（参考）	
	MALDI Biotyper 2.0[b]（Bruker Daltonik）	Advanced Spectra Classifier[c]（bioMérieux）
非葡萄球菌菌种		
Abyssicoccus albus	NA	NA
Aliicoccus persicus	NA	NA
Corticicoccus populi	NA	NA
Jeotgalicoccus aerolatus	NA	IVD
Jeotgalicoccus coquinae	NA	NA
Jeotgalicoccus halophilus	NA	NA
Jeotgalicoccus halotolerans	IVD	NA
Jeotgalicoccus huakuii	NA	NA
Jeotgalicoccus marinus	NA	NA
Jeotgalicoccus nanhaiensis	NA	NA
Jeotgalicoccus pinnipedialis	NA	NA
Jeotgalicoccus psychrophilus	NA	NA
Jeotgalicoccus schoeneichii	NA	NA
Macrococcus bovicus	NA	NA
布吕嫩巨型球菌	NA	NA
犬巨型球菌	NA	NA
Macrococcus carouselicus	NA	NA
解酪巨型球菌	IVD	IVD
Macrococcus equipercicus	NA	NA
Macrococcus hajekii	NA	NA
Macrococcus lamae	NA	NA
Salinicoccus albus	NA	NA
Salinicoccus alkaliphilus	NA	NA
Salinicoccus amylolyticus	NA	NA
Salinicoccus carnicancri	NA	NA
Salinicoccus halitifaciens	NA	NA
Salinicoccus halodurans	NA	NA
Salinicoccus hispanicus	NA	NA
Salinicoccus iranensis	NA	NA
Salinicoccus jeotgali	NA	NA
Salinicoccus kunmingensis	NA	NA
Salinicoccus luteus	NA	NA
Salinicoccus qingdaonensis	NA	NA
Salinicoccus roseus	NA	NA
Salinicoccus salsiraiae	NA	NA
Salinicoccus sesuvii	NA	NA
Salinicoccus siamensis	NA	NA

注：[a]FDA. FDA 批准的临床验证库；FDA-N. 未经临床验证的文库（应通过另一种方法确认种属鉴定）；RUO. 仅供研究使用；NA，不可用。[b]为 Microflex LT（Bruker Daltonik）设计；根据 Bruker-MBT_Lib_7171_IVD_Species（Bruker）的数据库包含的信息；目前，Bruker-MBT_Lib_7311_RUO_Species（Bruker）中没有与葡萄球菌相关的其他条目；截至 2017 年 11 月。[c]为 VITEK MS V3（bioMérieux）设计；根据 VITEK MS V3.0 数据库包含的信息。临床用途（bioMérieux）；当前，RUO SARAMIS 知识库 V4.14.0（bioMérieux）中没有与葡萄球菌相关的其他条目；截至 2017 年 11 月。[d]信息仅适用于该物种；没有有关亚种水平的信息。[e]制造商的注释："尽管其他亚种或菌种也包括在鉴定中，但亚种或菌种群是一个已鉴定的亚种或菌种。标识中包括的其他亚种或菌种仅供参考（VITEK MS V3.0 知识库。临床用途；bioMérieux）。[f]由制造商提供的关于中间葡萄球菌-假中间葡萄球菌的注释："亚种或菌种群组显示为低鉴别结果。应该在建议的亚种或菌种之间进行选择"（VITEK MS V3.0 知识库。临床用途；bioMérieux）

对于鉴定其他触酶阳性球菌，MALDI-TOF MS 的数据很少或不完整。Microflex LT 和 VITEK MS 数据库都包括一些微球菌和耳炎差异球菌。值得注意的是，数据库内容和质量及变量参数的标准化，如培养条件和时间等，都是实现可重复结果的关键。

目前，非破坏性技术，如傅里叶变换红外光谱(FTIR)和拉曼光谱已被开发作为葡萄球菌的快速鉴定的替代方法[159-160]。同时还能区分金黄色葡萄球菌是 SCVs 还是正常表型[161]。

6. 葡萄球菌毒素介导的综合征的诊断 诊断中毒性休克综合征(TSS)和葡萄球菌烫伤样皮肤综合征(SSSS)是以临床症状(血清学试验作补充)和检测葡萄球菌分离株(金黄色葡萄球菌，但也包括罕见的其他菌种)的毒素产物为诊断基础。有皮肤表现大多培养阴性，通常从疑似感染的部位取材可能分离到病原体。葡萄球菌引起 TSS 的病例血培养阳性率不到 5%。TSS 患者抗 PTSAg 的保护性抗体缺乏或水平非常低。但在血清转化期和恢复期可以检测到该抗体。SSSS 患者表皮剥脱素抗体也出现同样的现象。目前，可用的抗体检测只限于研究分析使用。除了识别急性发病特征和临床症状，葡萄球菌引起的食物中毒是难以确定的，因为留样食物可能不包含可培养的葡萄球菌，所以应该进行食物葡萄球菌肠毒素检测。

传统的免疫学方法可用于检测分离菌株的培养上清液、受污染的食物或患者标本中的毒素。检测菌株产生的 TSST-1 的试剂盒[TST-RPLA (ThermoFisher Scientific Oxoid) 和 TST-RPLA “Seiken”(Denka Seiken，Tokyo，Japan)]、葡萄球菌肠毒素[Ridascreen sets A、B、C、D 和 E(R-Biopharm，Darmstadt，Germany)、SET-RPLA “Seiken”(Denka Seiken) 和 SET-RPLA kit toxin detection kit(ThermoFisher Scientific Oxoid)]和表皮剥脱(exfoliative)[表皮溶解性(epidermolytic)]毒素 A 和 B[EXT-RPLA “Seiken”(Denka Seiken)]等试剂盒已经问世。有报道使用实时定量免疫 PCR 检测少量的肠毒素[162]。因为表型方法受到敏感性和特异性低的限制(与 PTSAg 交叉反应)，以及体外 PTSAg 表达受各种因素影响而为阴性，所以核酸分析法检测 PTSAg/ET 编码序列受到青睐[163-166]。

针对金黄色葡萄球菌 PVL 和其他杀白细胞成孔细胞毒素(pore-forming toxins)PCR 程序已经建立[58]。培养物中的 PVL 编码基因可通过 RIDA GENE PVL 试剂盒(R-Biopharm)作单项检测或作为 GenoType Staphylococcus 和 GenoType MRSA 测试板的一部分(Hain Lifescience)来检测。虽然 RIDA GENE PVL 试剂盒试验原本用于培养生长的细菌，但它被证明对脓液标本中编码 PVL 基因的检测具有敏感性和特异性[167]。已经研发了几种用于金黄色葡萄球菌培养物中 PVL 毒素检测的表型分析方法，如酶联免疫吸附试验、基于免疫层析膜的侧流试验和免疫层析试验[168-169]。

(二)微球菌科和皮生球菌科

微球菌和葡萄球菌由于其相似的细胞形态、革兰染色性质和触酶阳性等特征常常容易混淆。微球菌的确切种属关系常常被错误鉴定。常根据产色素、凸起的微球菌菌落可以推定为微球菌科和皮生球菌科成员。藤黄微球菌、变异库克菌和皮肤球菌属细菌菌落颜色为淡黄色(图 22-2)。克氏库克菌和西宫皮生球菌菌落颜色为橙色，玫瑰色库克菌为粉到红色菌落。一些菌种(如里拉微球菌)或通常有色素菌种的某些菌株可能不产色素。黏滑罗氏菌在常规血琼脂上形成黏液状或黏性的、透明到白色、无溶血的菌落，该菌在大多数情况下与琼脂紧密黏附(与链球菌不同)。该菌株与其他类似菌株的区别在于触酶弱阳性，在 5%的氯化钠条件下不生长。

临床实验室对微球菌菌株与葡萄球菌的初步鉴别可以通过它们对呋喃唑酮耐药[100 μg/片(ThermoFisher Scientific Oxoid)；耐药指抑菌圈直径<9 mm](译者注：上一版此处为≤9 mm，新版符合厂家说明书)和溶葡萄球菌酶耐药[20 μg/片(Mast，Bootle，United Kingdom)；耐药指没有抑菌圈](译者注：上一版此处为 200 μg/片，新版符合厂家说明书)，对杆菌肽敏感[0.04 U/片(ThermoFisher Scientific Oxoid)；敏感指抑菌圈直径≥10 mm]相区别。葡萄球菌属的成员敏感性与其相反(抑菌圈直径：呋喃唑酮≥15 mm；溶葡萄球菌酶，10～16 mm，杆菌肽没有抑菌圈)。详见表 22-3 和本手册之前的版本。与大多数葡萄球菌相反，微球菌改良氧化酶试验阳性。微球菌与葡萄球菌区分的一个参考方法是微球菌发酵葡萄糖的

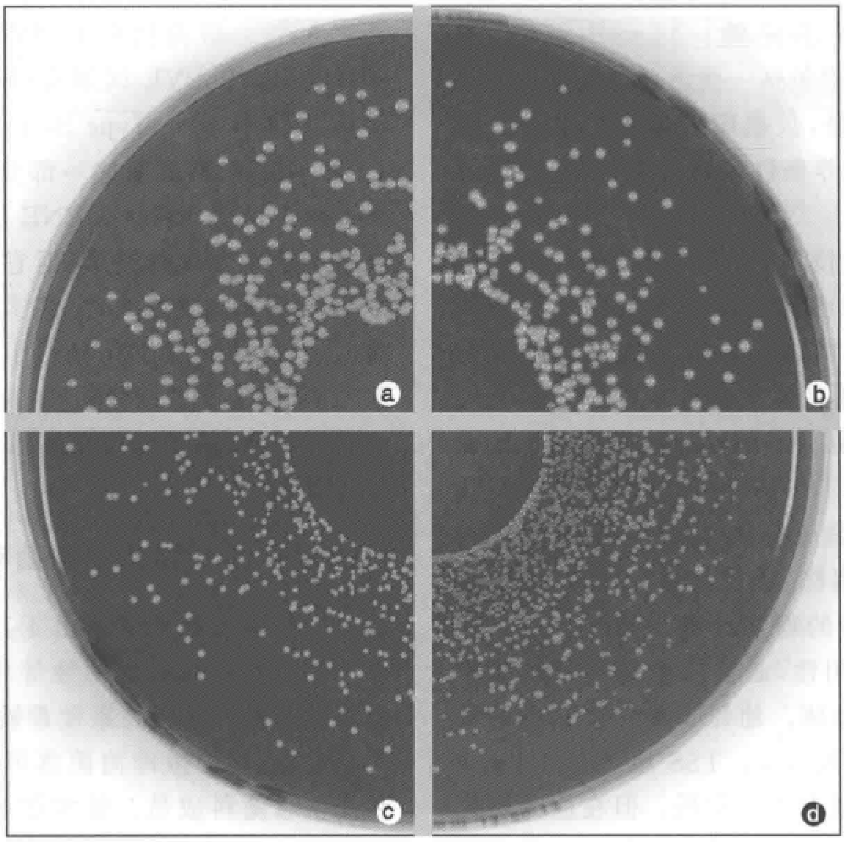


图 22-2 哥伦比亚琼脂孵育 48 h 藤黄微球菌形成黄色菌落(a)，里拉微球菌形成乳白色菌落(b)，玫瑰色库克菌柔和粉色菌落(c)，西宫皮生球菌形成橙色菌落(d)，见彩插

方式类似于非发酵菌的氧化-发酵试验，需要特定的氧化-发酵培养基和延长培养时间。与葡萄球菌相反，微球菌在厌氧条件不能分解葡萄糖产酸。

表 22-4 列出了区分这些菌种的关键生理特征。应用手工和自动鉴定系统对微球菌科和皮生球菌科的适用性数据在对应的葡萄球菌属章节里列出，但是其使用仅限于临床上一小部分微球菌菌种。据报道，在人类标本中发现的几个菌属，包括皮生球菌属、微球菌属、库克菌属、皮肤球菌属和罗氏菌属，已被 MALDI-TOF MS IVD 数据库收录，但是对其数据质量还缺乏系统性的研究。此外，微球菌目的其他菌种的条目可以在 MALDI-TOF MS 文库中找到(参见 Bruker 和 bioMérieux 各自的 IVD 和 RUO 列表)。对临床上可疑和特殊情况的菌株，推荐使用测序为基础的方法加以确认。

(三)差异球菌属

37℃孵育 48 h，差异球菌在血平板上形成小的 α 溶血的菌落。在含 5%兔血脑心浸出液琼脂上孵育 72 h 形成细小、湿润、微黄，部分溶血的菌落。可以在含 6.5%氯化钠琼脂及胆汁七叶苷琼脂上生长。10℃或 45℃不生长。耳炎差异球菌与其他类似菌株的区别在于其触酶阳性和氧化酶阴性，专性需氧菌，不能利用葡萄糖或其他碳水化合物产酸。API Strep gallery 板条(bioMérieux)可以鉴定耳炎差异球菌。该菌种是 MALDI-TOF MS IVD 数据库(Bruker 和 bioMérieux)的一部分。

由于该细菌惰性生化，鉴定结果常常需要用分子生物学方法加以确认。关于对疑似菌落的分子生物学确认，针对耳炎差异球菌特异 PCR 方法已有报道[170]。已经报道了一种直接检测临床标本中该菌的 PCR 检测方法，该方法是针对引起渗出性中耳炎的病原体进行多重检测的一部分[171]。

九、分型系统

应用于葡萄球菌的基于表型结构的现代方法

包括 MALDI-TOF MS 和全细胞指纹识别技术，如傅里叶变换红外光谱法(FTIR)，而传统的分型技术，如噬菌体分型、荚膜血清分型、药敏模式分析和其他生物分型方法，已被以测序为基础的分型方法所替代。数十年来使用 Sma Ⅰ限制性内切酶做宏观限制性模式分析(macrorestriction pattern analysis)的 PFGE 已经是公认的金标准方法。然而，PFGE 由于存在检测通量低、便携性差、命名法和重复性有限的问题而在很大程度上被放弃。值得注意的是，Sma Ⅰ无法切断 ST398 菌株。

确定金黄色葡萄球菌核心基因结构的参考方法仍然是 MLST[172]。其标准化操作就是对 7 个管家基因的等位基因多态性进行检测。可登录网络数据库(http://saureus. mlst. net/)(译者注：原著网址并不能获取金黄色葡萄球菌 MLST 相关数据，可参考 https://pubmlst. org/saureus/)获得数据。该方法的不足是 MLST 鉴定能力有限，在 MRSA 疫情调查和监测中检测通量低。对具有共同的祖先，但假定 MRSA 分离株具有不同流行病学起源的情况下，SCC*mec* 亚型可以提供更多信息(http://www. sccmec. org/)[173]。

spa 分型是一种针对金黄色葡萄球菌蛋白 A 基因(*spaA*)多态性的数量和高变的 X 区域串联重复序列多态性的方法。它是单点序列分型技术的基础，已经成为监测 MRSA 的主要基因分型方法之一[174-175]。该方法除了重复性好，其他的优点还包括成本低、通量高、命名标准化和可通过 SeqNet. org(http://www. seqnet. org/)创建的国际数据库(http://spaserver. ridom. de/)完成数据转化。但对特定的遗传谱系可能发生错误分类，需要使用附加试验补充分型。

其他用于葡萄球菌分子分型的技术包括基于谱带的分子指纹技术、核糖体分型、多位点可变数目串联重复序列(MLVA)和芯片。

最近，WGS 已开始取代传统的分子分型方法，成为一种通用方法，可为暴发调查、监测、检测未知和(或)新出现的菌株，以及预测给定菌株的临床重要性提供有用信息[176-177]。然而，成本(尽管正在快速下降)、生物信息学处理问题、缺乏通用命名法、对序列数据的解释颇具挑战性及缺乏商品化产品仍然阻碍了其使用。

虽然很多分型系统已经逐渐完善并用金黄色葡萄球菌进行过评价，包括抗菌药物耐药性分析、噬菌体分型、黏液产生试验、基因分型方法(WGS、PFGE 和核糖体分型)，但是这些方法很少应用于 CoNS 分型。

对于微球菌菌种，噬菌体分型和 PFGE 分型中各自使用的噬菌体和限制性内切酶与葡萄球菌分型中使用的不同。PFGE 和限制性片段长度多态性方法已经用于描述差异球菌属。

十、血清学试验

因为使用抗葡萄球菌抗体的血清学试验缺乏特异性和预测准确性，所以它在大多数葡萄球菌相关疾病的诊断中没有作用。有一例外就是当存在毒素相关综合征如 TSS 和 SSSS(见上文)时检测保护性抗体。对于本章讨论的其他菌种，检测抗体是没有临床意义的。

十一、抗菌药物敏感性

葡萄球菌属及相关菌属

1. 遗传学基础和抗菌药物敏感率 许多已发表的研究和综述描述了临床重要的葡萄球菌对抗菌药物和制剂的敏感性[26,178-180]。网络提供在线或公布的葡萄球菌耐药性数据也已建立，如国家医疗安全网络(NHSN，http://www. cdc. gov/hai/)、欧洲抗菌药物耐药性监测系统(EARS，https://ecdc. europa. eu/en/about-us/partnerships-and-networks/disease-and-laboratory-networks/ears-net)、亚洲耐药性细菌监测网(ANSORP，http://www. ansorp. org/)和国际医院感染控制联盟(INICC，http://www. inicc. org/espanol/esp_index. php)。

在从临床标本中分离的金黄色葡萄球菌和适应人类的 CoNS 中，青霉素耐药很常见(例如，金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌为 75%～80%)。由 *mecA* 基因或其同系物介导的甲氧西林耐药是最重要的耐药机制，因为它不能使用所有传统的 β-内酰胺类抗生素(青霉素类，第 1～4 代头孢菌素和碳青霉烯类药物)，对患者处置产生深远影响。

在葡萄球菌和巨型球菌菌种中引起 β-内酰胺类抗生素耐药的最重要机制是获得 *mecA* 基因或

其同系物。它们编码一个额外的青霉素结合蛋白(PBP)，即 PBP2a(由 *mecA* 编码)或 PBP2c(由 *mecC* 编码)，是传统 β-内酰胺类抗生素活性降低的原因。对于葡萄球菌，PBP 编码基因及其调节子是外源的可移动 DNA 元件的一部分，称为 SCC*mec*[181]；其可能起源于松鼠葡萄球菌群和(或)解酪巨型球菌[182-184]。最近，在金黄色葡萄球菌中发现了以前只在巨型球菌中出现的质粒编码 *mecB* 介导的耐药性[6,185]。已经报道的 *mecA* 基因的同系物，包括 *mecA*1 和 *mecA*2、*mecB*、*mecC*、*mecC*1、*mecC*2 和 *mecD*(迄今为止只在解酪巨型球菌中发现)[186-187]。有一个关于新的 *mecA* 基因同系物的命名指南[188]。拥有 *mecC*[189-190] 可导致功能性 PBP2a 同系物的表达，同样可导致甲氧西林耐药，尽管它对苯唑西林的亲和性高于头孢西丁，这会对药敏试验有影响(见下文)[189,191]。目前发现 12 个 SCC*mec* 主要变异型，Ⅰ～Ⅻ型和许多亚型[189-190,192-199]。SCC*mec* Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅵ和Ⅷ型与 HA-MRSA 菌株显著相关，Ⅳa、Ⅴ和Ⅶ型与 CA-MRSA 菌株相关。基于 *mecA* 的 LA-MRSA 菌株主要限于Ⅳ型和Ⅴ型 SCC*mec*，Ⅸ、Ⅹ和Ⅻ型 SCC*mec* 罕见报道[36]。与 *mecC* 相关的 LA-MRSA 的特征是拥有 SCC*mec* Ⅺ元件。

基于 PBP2 的错义突变导致对具有抗 MRSA 活性的新型头孢菌素如头孢比罗和头孢洛林耐药的报道逐渐增多。全球 MRSA 分离株中耐药率介于 3.9%～33.5%[200-202]。

HA-MRSA 常出现多重耐药，包括氨基糖苷类、磷霉素、夫西地酸、酮内酯类、林可酰胺类、大环内酯类、喹诺酮类、利福平、四环素类和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑等耐药[203-204]。虽然报道仍然很少，但是越来越多的金黄色葡萄球菌出现对新的抗生素耐药，如达托霉素、替加环素和噁唑烷酮类[利奈唑胺和特地唑胺(tedizolid)]。必须指出，质粒介导的利奈唑胺耐药是由于获得 *cfr* 和 *optrA* 基因[178,205-212] 造成的。编码修饰 23S rRNA 的甲基转移酶的可转移的多重耐药 *cfr* 基因不仅对利奈唑胺耐药，还对链阳菌素 A、林可酰胺类、氯霉素类和截短侧耳素耐药。除了包括特地唑胺的噁唑烷酮类药物外，*optrA* 基因编码的 ABC 转运蛋白(ABC transporter)还会引起对氯霉素类耐药[210,213]。

与 HA-MRSA 相比，CA-和 LA-MRSA 菌株对非 β-内酰胺类抗生素仍然更敏感；然而，在耐药谱方面的差异正在缩小[214-215]。几乎所有的 LA-MRSA CC398 菌株对四环素耐药[137]。

万古霉素中介金黄色葡萄球菌(vancomycin-intermediate *S. aureus*，VISA)(MIC 4～8 μg/ml)[216] 及其假定的前体，称为异质性 VISA(heterogeneous VISA，hVISA)菌株，首例是 1996 年在日本[217] 被确诊，然后在美国和其他地区相继出现。hVISA 和 VISA 耐药机制不是单个基因，而是复杂的、通过多途径获得的，多个途径包括细胞壁的改变导致重构和增厚同时自溶活性减少[218] 等共同作用。2002 年，14 株具有 *vanA* 基因的万古霉素耐药金黄色葡萄球菌(VRSA)的第一株在美国报道[219]。在美国之外，葡萄牙、巴西、印度和伊朗也报告了 VRSA。根据临床和实验室标准化研究所(the Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI)标准 M100-S27，金黄色葡萄球菌定义万古霉素耐药为 MIC≥16 μg/ml[216]。因为大多数 VISA 菌株同时对替考拉宁耐药，因此一些人更喜欢缩写词“GISA”，即糖肽中介金黄色葡萄球菌(glycopeptide-intermediate *S. aureus*，GISA)。少数临床分离株对替考拉宁耐药而对万古霉素完全敏感。最近报道了一株 VISA 菌株对一种长效脂糖肽类达巴凡星(dalbavancin)不敏感[220]。此外，对达托霉素异质性耐药或耐受的 hVISA 和 VISA 也已经发现[200-221]。

中间葡萄球菌群(*S. intermedius* group)的成员普遍出现对甲氧西林的耐药性，尤其是耐甲氧西林假中间葡萄球菌[methicillin-resistant *S. pseudintermedius*，MRSP]，以及对其他抗生素的耐药性[222-223]。

90%以上的医疗保健相关 CoNS(主要是表皮葡萄球菌和溶血葡萄球菌)由于产 β-内酰胺酶而对青霉素耐药，而医疗保健相关的分离株对甲氧西林和其他药物的耐药率高达 60%～80%[92]。已有头孢比罗和头孢洛林 MIC 增高的分离株报道。对于糖肽类，已有报道耐药的 CoNS 分离株主要对替考拉宁耐药。但是对替考拉宁的耐药分类很大程度上取决于所选用的折点[224]。总的来说，CoNS 对噁唑烷酮类药物的耐药性仍然是不常见的[211-212,215]。

除了对传统抗生素的耐药性外，现已注意到葡萄球菌对杀菌剂、防腐剂及重金属和类金属

(锌、铜和砷)的耐药性。由于常规使用铜和锌作为饲料添加剂,家畜的 MRSA 和 MR-CoNS 中重金属的耐药性尤为普遍,这潜在地促进对抗生素耐药性的共同选择[226-228]。

2. 抗菌药物敏感性试验　葡萄球菌的抗菌药物敏感性试验常规按照 CLSI 或欧洲抗菌药物敏感试验委员会(EUCAST)的参考方法文件的最新版本或本书第 72～75 章所述的商品化系统进行操作[216,229]。必须考虑 CLSI 和 EUCAST 折点(以前称为"解释标准")之间的差异。直接检测 MRSA 已经在上文"直接检测"部分中讨论。对于 SCVs,没有获批的方法用以确定药物敏感性。

在下列情况下进行表型检测时应特别注意:①检测青霉素酶的产生;②检测甲氧西林的耐药性;③检测对万古霉素降低的敏感性;④林可酰胺类的药敏试验(诱导耐药性);⑤达托霉素的药敏试验。

正确测定青霉素敏感性是临床医生决定使用青霉素治疗金黄色葡萄球菌感染的关键。CLSI 和 EUCAST 都警告说,使用 MIC 折点(敏感性为≤0.125 mg/L)或抑菌圈直径敏感性≥29 mm(10 单位/纸片)或≥26 mm(1 单位/纸片)可出现假敏感结果。他们推荐检测 β-内酰胺酶的产生,既可以评估抑菌圈边缘,也可以用 PCR 法检测 *blaZ* 基因[216,229-230]。值得注意的是,以头孢硝噻吩为基础的试验不具备用作确认试验必需的敏感性。对非金黄色葡萄球菌分离株,表型试验不可靠。

苯唑西林(或头孢西丁)耐药的菌株(MRSA)应被视为对目前所有的 β-内酰胺类耐药,包括青霉素类、碳青霉烯类和头孢菌素类(具有抗 MRSA 活性的头孢菌素除外)。葡萄球菌抗菌药物敏感性试验的一个重要任务就是检测 MRSA,特别是对 MRSA 高度准确的鉴定。值得注意的是,由于异质性耐药使传统方法在区分甲氧西林耐药和甲氧西林敏感分离株时的敏感性和特异性降低,同时对于金黄色葡萄球菌,苯唑西林临界耐药的金黄色葡萄球菌菌株的出现以 β-内酰胺酶的高表达为特征[231]。为了增强鉴别能力而使用头孢西丁检测 MRSA(*mecA* 和 *mecC* 介导)可以解决上述大部分问题。使用头孢西丁不再需要特定的试验条件(见本手册以前的版本)。然而,检测苯唑西林 MIC 时需要满足以下附加条件:在培养基中添加 2% NaCl、最高孵育温度 35℃和孵育时间满 24 h。甚至这些最佳条件都满足时,某些 *mecA*,尤其是 *mecC* 阳性的菌株,苯唑西林 MIC 仍低于折点,提示错误的敏感性。这种现象是由于一些 MRSA 分离株异质性表达 PBP2a,只有一小部分细菌群(10^{-8}～10^{-4})在体外试验表达为耐药表型。由于耐药表型的细菌亚群通常比敏感的细菌群生长更缓慢,所以可能会被忽视。

头孢西丁的 MIC 法和纸片扩散法(30 μg/片)是目前 CLSI 和 EUCAST(http://www.eucast.org)推荐用于检测金黄色葡萄球菌、路邓葡萄球菌和 CoNS 对甲氧西林耐药的首选方法。有关最新折点的信息,请参阅相应 CLSI 和 EUCAST 文件的最新版本[216,229]。由于头孢西林筛选法对假中间葡萄球菌耐甲氧西林的预测性低于其他葡萄球菌,因此,推荐使用苯唑西林纸片(1 μg)来检测基于 *mecA* 的甲氧西林耐药性[216,229,232]。基于同样的原因,最近也有人提议将假中间葡萄球菌苯唑西林的折点用于施氏葡萄球菌菌株[233](译者注:CLSI 从 2019 年起规定表皮葡萄球菌苯唑西林耐药性既可用头孢西丁筛选法,也可用苯唑西林纸片法)。

根据 CLSI,苯唑西林 MIC 法也可用于检测葡萄球菌对甲氧西林的耐药性,金黄色葡萄球菌和路邓葡萄球菌对苯唑西林和头孢西丁有不同的折点(头孢西丁 MIC≥8 μg/ml 为耐药;苯唑西林 MIC≥4 μg/ml 为耐药)[216]。对于假中间葡萄球菌和除路邓葡萄球菌外的 CoNS,*mecA* 可以通过较低的苯唑西林折点(MIC≥0.5 μg/ml 为苯唑西林耐药)来预测[216]。EUCAST 指出金黄色葡萄球菌和路邓葡萄球菌分离株头孢西丁 MIC＞4 μg/ml、腐生葡萄球菌分离株头孢西丁 MIC＞8 μg/ml 代表甲氧西林耐药。但是对于其他葡萄球菌菌种预测甲氧西林耐药时,头孢西丁 MIC 法不如纸片扩散法[229]。低生长率的 SCVs 可以阻碍纸片扩散法和自动化仪器确定这些菌株的敏感性[80,234-235]。

另一种检测甲氧西林耐药的方法是使用抗 PBP2a 单克隆抗体的乳胶凝集试验(MRSA screen;DenkaSeiken,Tokyo,Japan 和其他厂家)或免疫色谱分析(PBP2a culture colony test; Alere, Waltham, MA),这些方法可检测纯培养中的单个菌株。然

而,上述方法不能检测 *mecC* 或 *mecB* 介导的耐药分离株。对于 SCVs 如果使用乳胶凝集试验,那么菌落数量必须增加 100 倍[235]。

苯唑西林耐药决定基因和金黄色葡萄球菌菌种特异性标志物(见上文)必须同时出现,这是确证耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的金标准。特别是对异质性耐甲氧西林葡萄球菌,菌株表现为缓慢生长(SCVs)表型或金黄色葡萄球菌苯唑西林临界耐药,可以通过检测 *mecA* 基因判断培养的葡萄球菌分离株甲氧西林的耐药性[236]。当出现以培养为基础的方法显示为 MRSA,而分子生物学方法检测 *mecA* 和(或)SCC*mec-orfX* 结果阴性,不能解释以上情况时应该检测 *mecA* 同系物。该方法同样适用于需要分子生物学方法验证苯唑西林耐药性的 CoNS。使用纯菌落是这种方法的重要前提。目前,已有报道使用特定的寡核苷酸引物和探针用于多种基于扩增和芯片的方法来检测 *mecC* 和其他 *mecA* 等位基因[138,185,189,237]。

检测葡萄球菌对糖肽类敏感性降低是一项挑战。纸片扩散法无法区分敏感株与 hVISA 及 VISA 菌株,因此,CLSI 和 EUCAST 都不推荐用它来检测糖肽类敏感性。金黄色葡萄球菌和 CoNS 的糖肽类药物敏感性试验只能用 MIC 方法检测,且应在完整培养 24 h 后读取结果。

EUCAST 界值未解决导致糖肽不敏感的潜在的不同机制[229]。CLSI 保留了一个中介类别以区别于 *vanA* 阳性 VRSA 菌株。无论采用何种标准,从治疗的角度来看,MIC 在 4μg/ml 及以上的葡萄球菌分离株应被认为是完全耐药的。

根据 CLSI 指南,通过参考方法即微量肉汤稀释法(对于筛选,MIC≥8 μg/ml)、大多数 FDA 批准的自动化系统和含万古霉素(6 μg/ml)脑心浸出液筛选平板均能可靠地检测 VRSA 菌株(MIC≥16 μg/ml)[217]。常规药敏试验方法包括自动化方法检测 VISA 表型检测结果不可靠并被低估[238]。根据 CLSI 推荐,VISA 定义为万古霉素 MIC 为 4～8 μg/ml 的金黄色葡萄球菌[216]。CLSI 建议将万古霉素 MIC≥8 μg/ml 的金黄色葡萄球菌分离株送往参考实验室进行确认[216]。

为避免将 VISA/GISA 报告为"中介"并强调发现临床使用万古霉素反应低的 hVISA/VISA,EUCAST 大大降低了糖肽类 MIC 折点(对金黄色葡萄球菌万古霉素和替考拉宁>2 μg/ml 为耐药,对 CoNS>4 μg/ml 为耐药)[239-240]。虽然在金黄色葡萄球菌感染中,万古霉素的 MIC>2 μg/ml 时,使用万古霉素治疗的临床效果较差得到一致认可,但关于万古霉素的 MIC>1 μg/ml 时是否也与临床效果不佳有关,仍存在争议。似乎没有证据表明所谓的"万古霉素 MIC 漂移"现象普遍存在,但它可能作为局部问题出现[241]。

检测 hVISA 需要采用改良菌群分析策略-曲线下面积法(PAP-AUC)[229,242]。因为这个方法费力、复杂,不适合常规使用,已经开发了许多筛选检查包括抗生素复合琼脂和专门的梯度试验(macroEtest)[218,243]。

克林霉素诱导型耐药(inducible clindamycin resistance)只能在药物与大环内酯类联合测试时才能检测到,可以使用肉汤微量稀释法进行组合,也可以在进行纸片扩散法时将 2 个纸片相邻放置。有关详细信息,请参阅 CLSI 和 EUCAST 文件[216,229]。达托霉素只能使用 MIC 方法进行测试,并且需要调整培养基,使钙最终浓度为 50 μg/ml[216,229]。

有关抗菌药物敏感性试验的其他信息见本书第 72～75 章。CLSI 和 EUCAST 没有针对微球菌和差异球菌的特定药物敏感性标准。

葡萄球菌中如果潜在已知的遗传机制,并且是基因决定的,特定的 DNA 扩增方法或 WGS 可以用于检测耐药编码基因、各自的单核苷酸变异和转座子介导的耐药。WGS 与标准化的 EUCAST 纸片扩散法表型检测的符合率为 98.6%,表明 WGS 可以在计算机上预测金黄色葡萄球菌的抗生素耐药性模式[177]。

十二、结果的评价、解释和报告

区分葡萄球菌和微球菌是污染、定植还是感染对于实验室和临床医生仍是一个重要的挑战。必须考虑到提升标本质量的必要性。在结果解释过程中应将临床特征和其他检查的结果考虑在内。实验室工作人员和医生之间良好沟通同样也不能替代。

病原菌的培养和种水平的鉴定辅以体外药敏试验是诊断葡萄球菌感染的金标准(译者注:药敏试验主要是辅助治疗并非辅助诊断)。解释培养结果最关键的一步是,当怀疑葡萄球菌感染时,应

区分是金黄色葡萄球菌还是其他葡萄球菌。因为报告“金黄色葡萄球菌”尤其是“MRSA”对预后、治疗、医院卫生和感染控制十分重要，所以应该对菌种鉴定或苯唑西林和（或）头孢西丁药敏结果方面的任何不确定性用第二种独立的方法进行确认。考虑到成本和速度，适用的常规程序可能包括用于 MRSA 筛查目的的显色培养基、MALDI-TOF MS、自动化系统和用于鉴定和（或）药敏的乳胶凝集试验。如对鉴定存疑，应进行进一步的试验，优先选择基于核酸的方法。然而需要做附加试验时，必须权衡延迟通知医生初步鉴定可能的病原体为金黄色葡萄球菌的利弊。

为了避免在临床意义及感染预防和控制措施方面的误解，对银色葡萄球菌和 *S. schweitzeri* 的报告（如果特别区分的话）应包括一个修正提示，即这些菌种是金黄色葡萄球菌复合群的一部分。如果在这 2 个菌种中发现了甲氧西林耐药，推荐按照 MRSA 的建议进行，除非将来的研究证明有另一种方案。

在纯培养情况下，与感染（尤其是深部组织和血流相关的情况）有关的 CoNS 鉴定到种已经成为常规，而污染和定植的 CoNS 不需要进行鉴定和药敏试验。路邓葡萄球菌作为特例，其菌种鉴定是解释药敏试验结果的必要条件。同样也适用于凝固酶阳性的假中间葡萄球菌和凝固酶结果可变的施氏葡萄球菌，它们往往因乳胶凝集试验阴性而被误认为是 CoNS。使用新生霉素试验确认尿分离株是否为腐生葡萄球菌。其他 CoNS 逐渐成为重症感染的病原体。一些研究表明，培养 CoNS 的菌落难以区分可能是包含多个不同的菌种。延长培养时间至 72 h 可以使最初培养的不同菌落更容易识别，但也延长了最终报告时间。

除非有强有力的证据反对，从无菌部位（如抽吸脓液、血或脑脊液）分离金黄色葡萄球菌应该考虑其有很重要的临床意义。高质量的标本被金黄色葡萄球菌污染机会是罕见的，如果临床有疑问，需要进一步采集样本进行确认。解释从含正常微生物群的标本中分离金黄色葡萄球菌时需要考虑部位、临床特征和最近的干预措施。定量培养可能是有用的，如在解释支气管肺泡灌洗液或尿样本结果时。金黄色葡萄球菌心内膜炎患者，菌血症是高水平、持续存在的，而短暂性菌血症（如黏膜损伤性操作），菌血症是低水平，通常是短暂性的。因为定量血培养不是常规操作，开始孵育至检测到细菌生长的时间（定义为阳性报警时间）可以给连续监测血培养提供额外信息。金黄色葡萄球菌快速生长（开始孵育的 14 h 内）可能与血管内感染、延误清创和并发症高度相关。从手术伤口和其他部位，如从溃疡中分离的金黄色葡萄球菌，可能代表感染或定植，临床医生应该通过床旁评估感染的症状和体征来指导其对培养结果的应用。除非患者是 MRSA 定植且去定植作为特定的感染控制策略，否则对仅为定植的菌群进行治疗的依据不足。

解读 CoNS 培养阳性的意义比金黄色葡萄球菌更具挑战性。CoNS 是医疗保健相关血流感染（health care-associated bloodstream infections）的一个重要病原体，但也是血培养最常见的污染菌。采集血标本或活检时，如没有仔细进行皮肤清洁和消毒，皮肤或黏膜上的微生物群将会污染标本。然而，即使注意采集技术，同样也不能避免所有污染事件的发生。解释 CoNS 引起的血培养阳性需要了解血管内的假体材料、真正 CoNS 脓毒症的危险因素（如早产或免疫系统受损）和脓毒症临床特点。标本采集自有临床感染症状的患者，以下因素有助于区分影响临床治疗后果的真阳性培养和污染：①分离菌株来自感染部位或体液的纯培养。②在感染过程中重复分离相同的菌株或菌株组合[244]。减少由 CoNS 引起的医疗保健相关血流感染误判的方法是，5 天内至少 2 次血培养阳性均为同一种 CoNS 菌种或 1 次血培养＋临床感染证据[245]。

静脉导管尖端和血培养都是同一株 CoNS，是支持静脉导管相关性血流感染的证据。检测从中心静脉导管和外周静脉采集血培养的阳性报警时间差，对于短期和长期置管患者导管相关性血流感染的原位诊断具有高敏感性和特异性。但是，其他一些研究并没有表明这一方法具有重要的诊断价值。对怀疑感染的患者腹膜透析液或脑室分流术后获取的脑脊液中分离的 CoNS 通常是有重要感染意义的。虽然大多数污染标本是不同菌株和（或）菌种的混合培养物，但一些感染可能是由不止一个菌株或菌种引起的。

对于极有可能是一个真正 CoNS 感染的复杂患者，建议进一步采样分析，特别是在处理与植入

假体材料有关的轻度感染患者时，如关节置换或血管移植。标本应包括每个解剖层或区域，同时使用清洁的工具采集深部样本[246]。

药敏试验，特别是检测甲氧西林耐药性应始终在确定金黄色葡萄球菌和假中间葡萄球菌的鉴定后进行。对于检测 MRSA 定植的主动监测培养，除进行甲氧西林的耐药试验之外，接受去定植的患者可能还需要预测莫匹罗星治疗效果。在这种情况下，高水平莫匹罗星耐药检测试验是值得推荐的。所有引起真正感染的 CoNS 需要做药敏试验。

CoNS 临床意义的讨论也适合用于微球菌科和皮生球菌科的成员，然而，对于微球菌科和皮生球菌科与病因相关的污染和定植的区分标准比 CoNS 更严格。由于皮肤球菌属的菌株对某些 β-内酰胺类耐药，如果临床需要，应仔细与通常是敏感的其他微球菌相区别。

参考文献请扫二维码查阅

第23章 链球菌属

BARBARA SPELLERBERG, CLAUDIA BRANDT, PARHAM SENDI

（鲁炳怀 译；李敏、倪语星、宁永忠 审校）

一、分类学（taxonomy）

目前链球菌属（*Streptococcus*）包含的已知菌种与亚种有110余种。随着新一代测序技术（next-generation sequencing, NGS）应用范围不断扩大，链球菌属种类将进一步增加。每年都有确证的新链球菌种发布，这些链球菌多数来源于哺乳动物的口腔与消化道的黏膜，目前尚未发现其可致人类感染。本章主要介绍人样本中检出的已知或新发现的链球菌种，以及近年来链球菌分类学的变迁。链球菌属于厚壁菌门（firmicutes）乳杆菌目（the order Lactobacillales）链球菌科（Streptococcaceae）。目前明确的17种触酶阴性的革兰阳性球菌属，就包括从链球菌属中分离出去的肠球菌属（*Enterococcus*）、乳球菌属（*Lactococcus*）、乏养菌属（*Abiotrophia*）、颗粒链菌属（*Granulicatella*）、费克蓝姆菌属（*Facklamia*），以及圆短链菌属（*Globicatella*）（本章参考文献[1]与本书第24、25章有综述）。传统的链球菌菌种（Streptococcal species）的分类命名仅仅是依据溶血反应、菌落大小，以及携带何种兰氏抗原（Lancefield antigens），这种分类方法对于正确鉴定链球菌菌种存在一定局限，但由于该法创立已久，对于临床微生物工作者及医疗卫生行业人员依然大有裨益。传统分类方法与不同链球菌菌种所致的临床症状密切相关，可以将链球菌初步分成大类，有利于选择进一步的鉴定试验及指导经验用药。因此，本章中所列菌种鉴定方案，在许多方面依然遵循传统的表型分类体系（phenotypic classification system）。

传统分类法将链球菌分为β-溶血链球菌与非β-溶血链球菌。β-溶血链球菌，也称为化脓性链球菌（pyogenic streptococci），包括人源性致病菌，如化脓链球菌（*S. pyogenes*）、无乳链球菌（*S. agalactiae*）、停乳链球菌似马亚种（*S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*），以及多种重要的动物源性致病菌。“化脓性链球菌”命名较β-溶血链球菌更为确切，因为这一菌群的细菌也包括非β-溶血链球菌种，如停乳链球菌停乳亚种（*S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*），但不包括咽峡炎链球菌群中的β-溶血菌株，后者被划分为草绿色链球菌群（表23-1）。咽峡炎链球菌群菌落小（≤0.5 mm），这一特征有助于将其与化脓性链球菌的大菌落（>0.5 mm）鉴别。化脓性链球菌或β-溶血链球菌群进一步按照包含的兰氏抗原进行分类，部分兰氏抗原与常规链球菌种分类相关（表23-2）。

表23-1 草绿色链球菌群菌种及其与大的分类群之间的联系

缓症链球菌群[a]	咽峡炎链球菌群	变异链球菌群[a]	唾液链球菌群	牛链球菌群
澳大利亚链球菌	咽峡炎链球菌咽峡炎亚种	仓鼠链球菌	前庭链球菌	马肠链球菌（牛源）
嵴链球菌	咽峡炎链球菌 *whileyi* 亚种	道恩链球菌	唾液链球菌唾液亚种	解没食子酸链球菌解没食子酸亚种
戈登链球菌	星座链球菌星座亚种	变异链球菌	唾液链球菌嗜热亚种	解没食子酸链球菌巴氏亚种

（续 表）

缓症链球菌群[a]	咽峡炎链球菌群	变异链球菌群	唾液链球菌群	牛链球菌群
婴儿链球菌	星座链球菌咽炎亚种	鼠链球菌		解没食子酸链球菌 *macedonicus* 亚种
人乳链球菌	星座链球菌 *viborgensis* 亚种	表兄链球菌		婴儿链球菌婴儿亚种
马赛链球菌	中间链球菌			婴儿链球菌结肠亚种
缓症链球菌				非解乳糖链球菌
口腔链球菌 *dentisani* 亚种				
口腔链球菌口腔亚种				
口腔链球菌 *tigurinus* 亚种				
副血链球菌				
泛口腔链球菌				
肺炎链球菌				
假肺炎链球菌				
鲁布纳链球菌				
血液链球菌				
中国链球菌				

注：[a] 除外动物源性菌株

表 23-2 β-溶血链球菌的表型特征[a]

链球菌种	兰氏抗原群	菌落大小[e]	宿主	杆菌肽敏感试验	PYR[f]	CAMP[g]	VP[h]	马尿酸水解试验	海藻糖	山梨醇
化脓链球菌	A	大	人	+	+	−	−	−	+	−
无乳链球菌	B	大	人，牛	−	−	+	−	+	V	−
停乳链球菌停乳亚种[b]	C	大	动物	−	−	−	−	−	+	V
停乳链球菌似马亚种	A，C，G，L	大	人（动物）	−	−	−	−	−	+	−
马链球菌马亚种	C	大	动物	−	−	−	−	−	−	−
马链球菌兽瘟亚种[c]	C	大	动物（人）	−	−	−	−	−	−	+
犬链球菌[c]	G	大	犬（人）	−	−	+	−	−	V	−
咽峡炎链球菌[d]	A，C，G，F，无抗原	小	人	−	−	−	+	−	+	−
豕链球菌[c]	E，P，U，V，无抗原	大	猪（人）	−	+	+	+	V	+	+

注：[a] +．阳性；−．阴性；V．不定。[b] 停乳链球菌停乳亚种在羊血平皿上呈 α-溶血。[c] 马链球菌兽瘟亚种，犬链球菌，与豕链球菌主要为动物源性致病菌，很少从人分离。人分离的豕链球菌菌株大多数可能是新菌种假豕链球菌。[d] 咽峡炎链球菌群的链球菌种在羊血平皿上可呈 α-溶血、β-溶血或不溶血。[e] 菌落大小：大菌落，24 h 培养后 >0.5 mm；小菌落，<0.5 mm。[f] 含有吡咯烷酮氨肽酶（pyrrolidonyl aminopeptidase）。[g] CAMP 反应（存在金黄色葡萄球菌 β-溶血素时，可协同溶血）。[h] V-P 试验（糖发酵生成 3-羟基-2-丁酮）

非化脓性链球菌群（nonpyogenic streptococci）包括大多数的 α-溶血链球菌及非溶血链球菌，甚至还包括一些草绿色链球菌群大类中的 β-溶血链球菌种。一项依据核糖体小亚基（16S）rRNA 基因序列比对对链球菌属分类的研究，表明除了化脓性链球菌（β-溶血，大菌落）外，其余链球菌可分为 5 种草绿色链球菌种[1]。此类非化脓性链球菌群（nonpyogenic streptococci）分别被命名为缓症链球菌（*S. mitis*）群、咽峡炎链球菌（*S. anginosus*）群、变异链球菌（*S. mutans*）群、唾液链球菌（*S. salivarius*）群及牛链球菌（*S. bovis*）群（表 23-1）。还有一些链球菌种并未明确分类，尚未

分群[1]。

草绿色链球菌中，缓症链球菌群包括最多的相近的链球菌种，是最大的链球菌群。目前，该群包括澳大利亚链球菌（*S. australis*）、嵴链球菌（*S. cristatus*）、戈登链球菌（*S. gordonii*）、婴儿链球菌（*S. infantis*）、人乳链球菌（*S. lactarius*）、马赛链球菌（*S. massiliensis*）、缓症链球菌、口腔链球菌 *dentisani* 亚种（*S. oralis* subsp. *dentisani*）、口腔链球菌口腔亚种（*S. oralis* subsp. *oralis*）、口腔链球菌 *tigurinus* 亚种（*S. oralis* subsp. *tigurinus*）、副血链球菌（*S. parasanguinis*）、泛口腔链球菌（*S. peroris*）、肺炎链球菌（*S. pneumoniae*）、假肺炎链球菌（*S. pseudopneumoniae*）、鲁布纳链球菌（*S. rubneri*），血链球菌（*S. sanguinis*）、中国链球菌（*S. sinensis*），及几种动物源性的链球菌种。缓症链球菌群分类方法与命名在过去引起了很大的混乱。现在进行了些改变，其一是将原来的缓症链球菌模式菌株划归戈登链球菌，随后又代之以新型缓症链球菌模式菌株（NCTC12261^T）。最近基于全基因组序列数据分析综合研究，重新评估了缓症链球菌群的菌种命名，导致一些分类的变化。包括将 *S. oligofermentans* 命名为嵴链球菌，将虎链球菌（*S. tigurinus*）划分为口腔链球菌的亚种（*S. oralis* subsp. *tigurinus*）[3]。基于表型特征与分类学的考虑，还是将肺炎链球菌划归缓症链球菌群[2]，考虑到肺炎链球菌的临床意义，将在本章各部分单独论述。然而，肺炎链球菌与缓症链球菌群的其他菌种关系非常密切，16S rRNA 基因分析表明，肺炎链球菌与缓症链球菌及口腔链球菌的核酸序列相似率大于 99%。采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）技术鉴定时，也遇到类似的困难，表明对于缓症链球菌群的准确的菌种鉴定尚需其他技术的介入[3]。

小菌落咽峡炎链球菌（*S. anginosus*）群包括 3 个链球菌种，即咽峡炎链球菌（*S. anginosus*）、星座链球菌（*S. constellatus*）、中间链球菌（*S. intermedius*），其中咽峡炎链球菌又分为咽峡炎链球菌咽峡炎亚种（*S. anginosus* subsp. *anginosus*）与咽峡炎链球菌 whileyi 亚种（*S. anginosus* subsp. *whileyi*）。星座链球菌包括 3 个亚种，星座链球菌星座亚种（*S. constellatus* subsp. *constellatus*）、星座链球菌咽炎亚种（*S. constellatus* subsp. *pharyngis*）和星座链球菌 viborgensis 亚种（*S. constellatus* subsp. *viborgensis*）[4]。咽峡炎链球菌群包括以前称为兰氏抗原 F 群的链球菌，即“米勒链球菌（*S. milleri*）”群或“米勒链球菌”，但“米勒链球菌”在分类学上并未正式命名。变异链球菌群包括变异链球菌（*S. mutans*）、表兄链球菌（*S. sobrinus*）、仓鼠链球菌（*S. criceti*）、鼠链球菌（*S. ratti*）、道恩链球菌（*S. downei*），还包括很多目前仅从动物中分离到的链球菌种，如野鼠链球菌（*S. ferus*）、猕猴链球菌（*S. macacae*）、猪阴道链球菌（*S. hyovaginalis*），以及戴维斯链球菌（*S. devriesei*）。唾液链球菌群由 3 个明确的链球菌种构成：唾液链球菌唾液亚种（*S. salivarius* subsp. *salivarius*），前庭链球菌（*S. vestibularis*），唾液链球菌嗜热亚种（*S. salivarius* subsp. *thermophilus*），可见于奶制品。整个唾液链球菌群与牛链球菌群密切相关。有些现在划分为牛链球菌群的链球菌，如婴儿链球菌（*S. infantarius*）与非解乳链球菌（*S. alactolyticus*）[5]，以前曾归属于唾液链球菌群[1]。

牛链球菌属的分类在过去发生了重大的变化[5,6]。这些变化是因为 DNA-DNA 复性的研究（DNA-DNA reassociation study）结果表明人源性牛链球菌属不同生物型的菌株有相当大的异质性。目前认为存在 4 种 DNA 群，DNA Ⅰ 群（cluster）包括动物来源的牛链球菌与马肠链球菌（*S. equinus*），研究表明，这些菌属于同一菌种。早期的菌种名马肠链球菌被正式采用。DNA Ⅱ 群包括解没食子酸链球菌（*S. gallolyticus*），下含 3 个亚种：解没食子酸亚种（以前称为牛链球菌生物型 Ⅰ），巴氏亚种（以前称为牛链球菌生物型 Ⅱ.2），以及 macedonicus 亚种。DNA Ⅲ 群包含婴儿链球菌（以前称为牛链球菌生物型 Ⅱ.1），其中包括 2 个亚种：婴儿亚种与结肠亚种（以前称为巴黎链球菌）。DNA Ⅳ 群包括非解乳链球菌。

二、链球菌属概述

链球菌属的细菌为触酶试验阴性，<2 μm 的革兰阳性球菌，在液体培养基中易成链状生长。多数链球菌属的菌种 DNA 的 G+C 含量较低，介于 34%～46%。链球菌细胞壁构成属于典型革兰阳性菌，主要成分是肽聚糖，其中，葡糖胺与胞壁

酸组成肽聚糖的氨基糖部分，而半乳糖胺组成肽聚糖的可变区。多种碳水化合物、表面蛋白抗原和磷壁酸黏附在细胞壁上，不同种内与种间链球菌主要因此所致。链球菌为兼性厌氧菌。由于缺乏血红素化合物，链球菌无法进行呼吸代谢。糖与其他碳水化合物以发酵方式进行代谢，乳酸是主要的代谢终产物。在液体培养基中加入糖或其他碳水化合物虽可促进链球菌生长，但可导致其pH下降，如果培养基不是较强的缓冲体系（如Todd-Hewitt肉汤），链球菌生长将会受到抑制。所有的链球菌与肠球菌均可产生亮氨酸氨肽酶(leucine aminopeptidase，LAP)，此外，乳酸球菌(lactococci)、小球菌(pediococci)及其他的触酶阴性、革兰阳性的球菌也可生成LAP。产LAP可将上述菌与不产LAP的气球菌属(*Aerococcus*)与明串珠菌属(*Leuconostoc*)进行鉴别。除了动物源性的袋鼠链球菌，其他所有链球菌接触3%过氧化氢均为过氧化氢阴性[7]。如果链球菌在血琼脂生长，可出现触酶试验假阳性。

三、链球菌流行病学与传播

链球菌可致人类感染，也可以感染多种不同动物，包括哺乳动物与鱼类。不同链球菌种常常是黏膜组织的共生菌。有时链球菌也可能构成一过性皮肤微生物群。有些链球菌种表现出高毒力，但即使是高致病性链球菌种也常常会成为定植菌。2015年，肺炎链球菌在美国引起将近29 500例侵入性感染，导致大约3500例死亡(http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/surv-reports.html)，但该菌在很多无症状携带人群的上呼吸道（如鼻咽部定植）检出，属于定植的菌种。肺炎链球菌的携带率与年龄相关，儿童检出率介于30%～70%之间，而健康成人的携带率低于5%[8]。成年人如在家庭生活中与学龄前儿童起居在一起，肺炎链球菌的定植率显著增高，表明该菌在父母子女之间可发生家居传播。化脓性链球菌中也有定植菌株的存在。化脓链球菌的咽部无症状定植可见于5%以下成人，无乳链球菌的泌尿生殖道与胃肠道定植可见于10%～30%的成人。

由于有CDC新发感染项目网(CDC's Emerging Infections Program network)的活跃细菌核心监测(Active Bacterial Core surveillance，ABCs)项目的存在[9]，得到可靠的流行病学数据，在美国，因肺炎链球菌、化脓链球菌（A群），以及无乳链球菌（B群）所致侵袭性感染达3000万人。2015年，美国全国范围内，化脓链球菌致15 540例侵袭性感染，1570例死亡，受累人群最多的是65岁以上老年人群。无乳链球菌所致的侵袭性感染仅次于肺炎链球菌，感染病例约为28 550例，死亡1770例。对B族链球菌(GBS)所致感染流行病学变化趋势的回顾研究表明，侵袭性感染受累人群最多见于50岁以上成人。链球菌感染可通过多种途径传播。致病性链球菌，如化脓链球菌与肺炎链球菌，定植于上呼吸道，主要通过直接接触或飞沫传播。传播后病原菌先定植在感染部位，具有进一步发生感染的可能性。母婴传播是新生儿侵袭性无乳链球菌感染的主要传播方式。另一种可致母婴传播的链球菌为变异链球菌，该菌可致龋齿，传播多发生在婴幼儿早期，多数通过口腔分泌物传播。

链球菌感染并不属于经典的人畜共患病。大多数链球菌种都有各自偏宜的宿主，尽管偶然的动物-人之间的传染确有发生，如猪链球菌(*S. suis*)与无乳链球菌所致感染病例就是如此[10-11]。动物源性与人源性链球菌株的基因型与表型分析表明，致人感染与致动物感染的菌株之间差异明显。人感染的β-溶血C群与G群链球菌被命名为停乳链球菌似马亚种，而动物源性C群与L群链球菌被分类为停乳链球菌停乳亚种，动物源性的G群链球菌菌株被分类为犬链球菌[12-13]。其他密切相关的动物致病G群链球菌种包括马链球菌马亚种与马链球菌兽瘟亚种。停乳链球菌似马亚种菌株的主要来源为人类宿主，人际传播常有发生。

四、临床意义

（一）化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)［A群链球菌(Group A *Streptococci*)］

化脓链球菌(*S. pyogenes*)定植于人的咽及皮肤等部位，具有复杂的毒力机制，可免受宿主的防御[14]。上呼吸道与皮肤破损处是该菌感染的主要部位，也是主要传染源。根据毒素介导或免疫介导机制不同，化脓链球菌可引起浅表感染或深部感染。该菌也是咽炎与脓疱病的最常见病因。在以前，化脓链球菌也是产褥热与产后脓毒症的常

见原因。化脓链球菌可以引起侵袭性感染，包括菌血症，脓毒症，化脓性关节炎，皮肤-组织感染，如丹毒、蜂窝织炎与坏死性筋膜炎。比较少见的感染类型包括肌炎、骨髓炎、肺炎、脑膜炎、心内膜炎、心包炎、新生儿感染。化脓链球菌可产一种或多种红疹外毒素，引起密集的红斑砂纸样的皮疹，此类皮疹是猩红热的典型特征。猩红热很少导致全身性毒素效应，但是当产生大量超抗原诱导细胞因子与淋巴因子时，也可表现出严重的症状，如链球菌中毒性休克综合征(STSS)。化脓链球菌所致的非化脓性并发症包括链球菌感染后肾小球肾炎(poststreptococcal glomerulonephritis)及急性风湿热。化脓链球菌致咽部感染后可出现上述 2 种疾病，但是致皮肤感染后仅会发生肾小球肾炎。化脓链球菌还与儿童自身免疫神经精神疾病相关[15]。目前，该领域的研究非常活跃。

自从 20 世纪 90 年代中期以来，STSS 通常与坏死性筋膜炎及侵袭性化脓链球菌感染复发相伴发病，其发病原因多无法解释。然而，致 STSS 的化脓链球菌菌株中，相当一部分菌株在毒力调控区存在变异[16]。目前，通过化脓链球菌高毒力克隆株的亚型分析发现，与 STSS 相关最常见的 M 型一直是 M1 与 M3 型，约 50%的侵入性感染由这 2 型所致。由于相同 M 型(M1 与 M3)菌株也可引起较轻的感染，因此，宿主因素与疾病状态可能是感染轻重不同的原因。除外 STSS 的侵袭性感染最多见于幼儿与老年人群。其他有 STSS 风险的人群包括罹患糖尿病、急性皮肤屏障破损(包括水痘)、慢性心肺疾病、HIV 感染，以及静脉吸毒或酒精成瘾者[17]。接触 STSS 患者的人群发生严重侵入性感染的风险据估计是普通人群的 200 倍，但是大多数的接触者表现为无症状定植[18]。

(二)无乳链球菌(*S. agalactiae*)(B 群链球菌)

无乳链球菌是引起侵袭性新生儿感染的主要病原菌。尽管有些死胎是因为产前播散所致，新生儿通常在分娩过程中感染无乳链球菌。新生儿感染呈现 2 种不同的临床类别：早发型新生儿感染，其特点为出生后 7 日内出现脓毒症与肺炎；晚发型新生儿感染，出生后 7 天～3 个月之间出现脑膜炎与脓毒症。进展为侵袭性新生儿感染最重要的危险因素为产妇泌尿生殖道或胃肠道定植无乳链球菌，孕期妇女的定植率为 10%～30%。至少在分娩前 4 h 进行抗生素预防，可有效避免大多数早产型新生儿感染。美国官方 CDC 用于预防新生儿无乳链球菌感染的推荐方案于 1996 年发布，随后分别在 2002 年与 2010 年进行了修订[19]。这些指南的实施，大幅度地减少了早发型新生儿 GBS 感染，但对于晚发型新生儿感染无显著影响。产后母亲或医护人员将无乳链球菌传播给新生儿，可能与大多数晚发型新生儿感染相关。成人患者中的侵袭性无乳链球菌感染呈上升趋势，多发生在老年患者，或免疫能力低下的成年患者，如酒精成瘾、糖尿病、癌症等人群[20-21]。成年患者的感染种类包括无原发灶的菌血症、皮肤与软组织感染、骨关节感染。感染的类型还包括肺炎，脑膜炎、心内膜炎，以及尿路感染。

(三)停乳链球菌似马亚种(人源性 C 群与 G 群链球菌)

停乳链球菌似马亚种为人源性分离菌株，大菌落，β-溶血，具有 C 群或 G 群兰氏抗原。尽管大部分停乳链球菌似马亚种具有 C 群或 G 群兰氏抗原，也有小部分菌株含有 L 群或 A 群抗原。停乳链球菌似马亚种致感染的类型与化脓链球菌相似[12]，是因为停乳链球菌似马亚种感染菌株存在类似于化脓链球菌的毒力基因，如 *emm* 样基因。停乳链球菌似马亚种可从以下感染中分离出来：上呼吸道感染、皮肤感染、软组织感染，以及侵入性感染，如坏死性筋膜炎(necrotizing fasciitis)、STSS、菌血症、关节炎、骨髓炎和心内膜炎。但是，目前还没有令人信服的研究发表，能够证实停乳链球菌似马亚种可以导致猩红热。停乳链球菌似马亚种可导致与化脓链球菌相似的肾小球肾炎(GN)与急性风湿热(ARF)，相关病例已见报道[22-23]。

(四)肺炎链球菌

肺炎链球菌在本章单独描述，是因为其临床特征与其他的缓症链球菌群的菌种差异较大。肺炎链球菌是成人社区获得性肺炎(CAP)最常分离的呼吸道病原(81%～87%)，血培养阳性率高达 16%[24]。肺炎链球菌也是儿童与成人脑膜炎患者的重要病原，发病率与病死率均较高。肺炎链球菌所致的感染最常见的是中耳炎。在美国，据估

计60%的3岁以下儿童平均会有1次或以上中耳炎感染[25]。肺炎链球菌所致的其他感染包括鼻窦炎与腹膜炎，以及少见的心内膜炎。肺炎链球菌定植于上呼吸道，特别在儿童中更易定植，但没有感染的证据。预防肺炎链球菌感染可采用免疫方案。2岁以下的儿童，CDC推荐常规系列接种4剂13价联合疫苗(conjugate vaccine)(2、4、6、12个月各一剂)。对于65岁及以上的老年人，以前未接种过疫苗，推荐接种13价联合疫苗，至少一年之后接种23价荚膜多糖疫苗。肺炎链球菌疫苗在过去数年间的广泛使用，使得侵袭性肺炎链球菌感染数量大为下降，但是侵袭性感染与非侵入性感染的肺炎链球菌血清型也随之变化[26-27]。近来13价联合疫苗的接种，导致了疫苗所含的血清型的肺炎链球菌在鼻咽部定植率普遍下降[29]，降低了儿童中侵入性疾病造成的沉重负担[27,29]。假肺炎链球菌(*S. pseudopneumoniae*)与肺炎链球菌高度相关，数年前自肺炎链球菌划分出去，独立成种[30]。假肺炎链球菌菌株无荚膜，胆汁不溶解，仅在空气条件下培养时奥普托欣敏感。此外，假肺炎链球菌菌株常分离于下呼吸道感染的患者，此类患者多有易患因素，如慢性阻塞性肺疾病(COPD)[31]。

(五)肺炎链球菌之外的缓症链球菌群

缓症链球菌群的各种链球菌成员数量众多，异质性大(表23-1)，是口腔、消化道、女性生殖道的常见定植菌群。缓症链球菌可作为正常皮肤一过性定植菌群，从血培养中分离出的此类菌可能是污染菌。与此同时，这些菌也是细菌性心内膜炎中最常见感染菌，可自心脏瓣膜分离，少数情况下也可见于人工瓣膜感染。因此，需要对临床状况进行小心评估，方能正确分辨自血培养分离的缓症链球菌群的临床意义。对于粒细胞缺乏症患者，化疗后出现免疫抑制，缓症链球菌群中的链球菌种常可引起此类患者致命的脓毒症与肺炎[32]。青霉素高耐药菌株的出现导致对此类感染的治疗更加复杂。

(六)咽峡炎链球菌群(*S. anginosus* group)

咽峡炎链球菌群(包括咽峡炎链球菌、星座链球菌与中间链球菌)是口咽部、泌尿生殖道及胃肠道微生物菌群的共生菌，与脑部、口咽部或者腹腔的脓肿形成密切相关。此外，最近研究提示，咽峡炎链球菌群为囊性纤维化患者呼吸道感染的新兴病原菌[33]。该链球菌群的所有菌种均为小菌落(菌落大小≤0.5 mm)，可呈现不同类型的溶血(α、β、γ)。这些菌种也可能含有兰氏抗原A群、C群、F群或G群(或不含任一抗原)，因此将这类产生小菌落的细菌与产生大菌落(>0.5 mm)、β-溶血的化脓性链球菌鉴别非常关键。已有报道称某一种菌种与特定的感染部位关系密切，如咽峡炎链球菌经常自泌尿生殖道或消化道的样本分离，而星座链球菌常自呼吸道分离，中间链球菌最多分离于脑部或肝的脓肿。

(七)唾液链球菌群(*S. salivarius* group)

唾液链球菌群包括唾液链球菌唾液亚种与前庭链球菌，最初自口腔与血液中分离出来。该链球菌群的另一个链球菌种，唾液链球菌嗜热亚种，仅见于奶制品。唾液链球菌唾液亚种多次报道为菌血症、心内膜炎及脑膜炎(偶尔为医源性)的致病菌，而前庭链球菌尚未明确与人类感染的关联。血培养分离出唾液链球菌某种程度上与肿瘤生成有关[34]。

(八)变异链球菌群(*S. mutans* group)

变异链球菌与表兄链球菌均属于变异链球菌群。这2个菌种是变异链球菌群最多见的人临床样本分离菌种，通常可自口腔分离。仓鼠链球菌、鼠链球菌及道恩链球菌偶尔可从人源性样本分离出，此外的其他变异链球菌群的链球菌种(野鼠链球菌、猕猴链球菌、猪阴道链球菌及戴维斯链球菌)仅可以从动物中检出。变异链球菌是龋齿的首要病原菌，感染具有可传播性。西方人群中，正常生活状态下，变异链球菌在2周岁～3周岁末期间开始永久定植。母婴分离菌株间的分子生物学研究表明，婴儿的变异链球菌菌株通常来自母亲，婴儿的定植率也有赖于母亲携带的菌量[35]。对血培养的链球菌进行分析表明，变异链球菌是变异链球菌群中最常见的致脓毒症菌种[1]。

(九)牛链球菌群(*S. bovis* group)

这一链球菌群命名发生了重大的变化，以前熟知的人源牛链球菌，现在被划分到不同的菌种。牛链球菌群现在包括马肠链球菌、解没食子酸链球

菌、婴儿链球菌及非解乳糖链球菌。该群的菌种经常从菌血症、脓毒症及心内膜炎患者的血培养中检出。血培养检出牛链球菌群的不同菌种的临床意义如下:解没食子酸链球菌解没食子酸亚种与胃肠道疾病,如结肠癌及慢性肝病有关;解没食子酸链球菌巴氏亚种与婴儿脑膜炎相关[36-37]。

(十)人类样本中较少分离的其他链球菌

某些链球菌主要为动物致病菌,偶尔也可自人类宿主分离到,多数情况下这些患者与动物有密切接触史。猪链球菌、豕链球菌及海豚链球菌均属于此类链球菌。猪链球菌主要是猪致病菌,偶尔或从人类脑膜炎与脓毒症感染病例中分离,并可引起人群的暴发[38]。猪链球菌有荚膜,在羊血琼脂平板上呈 α-溶血,有些菌株在马血琼脂平板上呈 β-溶血。猪链球菌菌株兰氏抗原可呈 R 群、S 群或 T 群阳性,抗原鉴定有助于将猪链球菌与表型相似的菌种,如戈登链球菌、血链球菌与副血链球菌相鉴别。豕链球菌与猪链球菌的情况相似,其兰氏抗原主要为 E、P、U、V,主要为猪的致病菌。β-溶血的豕链球菌菌株很少能从人外周血、伤口及女性生殖道分离[39]。对从女性生殖道分离的豕链球菌菌株进行分子生物学研究的结果表明,这些菌株属于新链球菌种,被命名为假豕链球菌(*S. pseudoporcinus*)[40]。假豕链球菌在女性生殖道的分离率可能比以前认为的要高[41]。海豚链球菌为鱼类致病菌,β-溶血,但是没有任何兰氏抗原,可以从有软组织感染、菌血症、心内膜炎和脑膜炎的患者中分离,这些患者通常都与处理鱼类史相关[42]。其他与水产品及人类感染相关的链球菌种包括香港链球菌(*S. hongkongensis*)与灰海豹链球菌(*S. halichoeri*)。香港链球菌与海豚链球菌及副乳房链球菌关系密切,可引起与鱼类有密切接触人员的侵袭性感染[43]。灰海豹链球菌最初自海豹分离鉴定,但最近在人样本分离[44]。

五、样本的采集、转运与贮存

对疑有链球菌的临床样本,应按照本书其他章节列出的方法采集(第 19 章)。因为很多链球菌菌种很快会失去活性,最好将拭子置于潮湿的转运培养基中,样本尽快处理。如果转运时间少于 1~2 h,不一定需要特殊的转运培养基。化脓链球菌在干燥拭子上转运,可安全存活;干燥条件可抑制样本中混杂的其他微生物,从而有利于化脓链球菌的检出[45]。孕产妇人群筛查无乳链球菌定植时的拭子采样与贮藏,美国 CDC 发布过详细的推荐方案[19]。这些推荐内容总结在本章"无乳链球菌筛查的特殊程序"中。

六、直接检查(direct examination)

(一)显微镜检查

显微镜检查显示链球菌为革兰阳性菌,链状生长,长短不一。肺炎链球菌菌株常呈革兰阳性双球菌,菌体延伸略长,采用显微镜检明确将肺炎链球菌与肠球菌及其他链球菌区分,难度较大。血培养样本中,肺炎链球菌可形成长短不一的链状,与其他链球菌形态相近。采用显微镜法鉴定链球菌对于无菌部位采集的临床样本,特别是脑脊液(CSF)等,帮助极大。脓肿或腹膜炎相关性穿刺液中,见到小而不规则的球菌,链状成簇,常提示为咽峡炎链球菌群。对于非无菌部位样本革兰染色结果解释,非常困难,因为有定植微生物群干扰,这些微生物经常包括链球菌,因此,如咽拭子,就不能用来做革兰染色检查以诊断"链球菌"咽炎。

(二)化脓链球菌咽拭子样本的直接抗原检测

化脓链球菌是急性咽炎最常见的病原菌,15%~30%的儿童急性咽炎,5%~10%的成人急性咽炎中化脓链球菌是病原菌。如果能提供快速诊断,可以迅速开始抗生素治疗,缓解症状,避免后遗症的出现,减少传播。很多商品化试剂采用凝集法或免疫试验(酶法、脂质体法或光学检测),直接检测咽拭子中的 A 群特异性糖链抗原,也称为"快速抗原试验"。快速抗原试验敏感性,在成人中达 90%,儿童患者中 80%~90%[46]。虽然这些试验可提供快检结果,利于早期治疗决策,但是咽部样本培养依旧是诊断金标准。因此,当儿童或青少年患者有典型的临床症状,快速抗原结果阴性时,应采用培养法确认。对于成年患者,多年以来认为,如果快速抗原检测为阴性,没有必要进行确认试验,除非临床高

度怀疑该菌感染，希望采用咽拭子培养确保最高的敏感性[47]。快速抗原检测的特异性一般较高，假阳性结果可见于以前诊断和(或)接受过化脓链球菌感染治疗的患者[48]。此外，成人患者中，快速 A 群抗原试验阳性预测值较低，常导致不必要的抗生素治疗。

(三)肺炎链球菌尿样本中抗原检测

免疫层析法检测细胞壁相关的多糖抗原(C-多糖抗原)，据报道这类抗原存在于所有已知的肺炎链球菌血清型表面，该方法有助于鉴定成年患者的肺炎链球菌感染，特别是那些已接受过抗生素治疗的患者。与传统的诊断方法相比，尿样本检测抗原法的敏感性为 50%～80%，特异性高于 90%[49]。肺炎链球菌感染后，该试验可持续阳性 1～6 个月[50]。对肺炎链球菌无症状的携带者，尿抗原试验也呈阳性反应[51]，因此其对于儿科患者诊断价值有限，不应用于 6 岁以下幼儿，对于肺炎链球菌定植率较低的学龄儿童，还未开展全面的研究。目前，此试验仅推荐用于成人，作为传统诊断肺炎链球菌培养方法的补充[52]. 可能对于那些在未取得培养结果，但已使用抗生素治疗的成年患者大有裨益。

(四)脑脊液中检测链球菌抗原

已有商品化试剂盒可用于检测脑脊液(CSF)样本中病原微生物的抗原，包括无乳链球菌与肺炎链球菌。此类试验也可用于血培养阳性样本。但相关试验不推荐常规应用，因为检测结果不应更改基于临床与检验标准制定的经验性治疗。研究显示 CSF 样本直接抗原检测的敏感性较低(<30%)，与传统的细菌离心涂片革兰染色相比，无任何优势[53]。然而，采用肺炎链球菌尿抗原试剂检测 CSF 样本，结果表现良好[54]，尿抗原试验的这种应用已得到 FDA 的认可。

(五)核酸检查方法

1. 化脓链球菌 基于化学发光单链核酸探针方法，用于鉴定特征的 rRNA 序列的 A 群链球菌快检试验(Group A Streptococcus Direct Test)，可快速检测咽部样本中化脓链球菌。该方法与培养方法比较结果较好。探针试验的敏感性为 89%～95%，特异性为 98%～100%，相较而言，培养方法结果显示敏感性为 98%～99%[48]。这些数据表明，探针试验可作为初筛试验或者作为抗原试验阴性时的备选试验，咽拭子培养批量筛查时尤其适用。最近，若干种用于直接检测化脓链球菌的商品化核酸扩增方法已经上市。一些相对复杂些的检测方案，如 Illumigene Group A Streptococcus(Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, OH)、Cepheid Group A Strep Xpress(Cepheid, Sunnyvale, CA)、Simplexa Group A Strep Direct test(Focus Diagnostics, Cypress, CA)及 the CLIA-waived Cobas Strep A test(Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)，已经得到 FDA 的批准。上述实验方法可用于检测咽拭子中是否存在化脓链球菌，并在不到 1 h 内得到检测结果。临床研究报告其敏感性均在 90%以上，高于快速抗原检测试验[55-56]。因此，根据厂家的说明，Cepheid Group A Strep Xpress 与 the Cobas Strep A test 结果无需培养验证，而其他的检测如有阴性结果，需用培养法进一步确认。

2. 无乳链球菌 目前已开发评估了几种基于核酸的方法，用于检测孕妇是否有无乳链球菌定植。目前，有 7 种核酸扩增试验(nucleic acid amplification tests, NAATs)已获 FDA 批准，其中有部分试验在增菌培养后检验，也有试验直接用于临床样本检测，无须增菌。此类试验的费用与选择性增菌培养相比非常高昂，其设计目的在于短时间内提供检测结果，以便在临产时评估阴道/直肠的无乳链球菌定植状况。尽管 PCR 试验在分娩时检测，可提供快捷的结果，但是许多孕妇入院后几小时就会分娩，这种方法经常不足以指导在分娩前后是否给予有效抗生素预防。因此，CDC 并不推荐在分娩时常规开展 NAAT 筛查试验。最近 CDC 推荐的分娩前无乳链球菌筛查方案，包括 NAAT 检测，但是推荐仅在选择性培养基增菌培养后进行检测[19]。增菌步骤可以大大提高 NAAT 检测无乳链球菌定植的敏感性。

3. 肺炎链球菌 几种实验室研发的 NAAT 方法已用于鉴定培养出的菌株是否为肺炎链球菌。这些分子试验通过检测自溶素 *lytA* 基因、肺炎链球菌表面抗原 *psaA* 基因，以及肺炎自溶素基因 *ply* 鉴定肺炎链球菌。PCR 检测 *lytA* 特异性最好，有助于区别难鉴定肺炎链球菌，以及相关性高的非典型链球菌不同菌株[57-58]。*psaA* 基因检

测结果尚可，但是以检测不同肺炎自溶素基因为靶点的试验方法特异性相对较差。目前为止，这些试验都没有商品化试剂可用，仅为实验室研发项目。近期发表研究发现，实时定量PCR，可直接从鼻咽部拭子检测 *lytA* 基因[59]。这些研究的结果表明，对于明确感染肺炎链球菌肺炎患者，PCR方法极有应用前景。未经FDA认证的商业化多阵列方法已包含肺炎链球菌特异性的引物，可用于检测呼吸道标本的病原菌，这类试剂盒有Fast-track Diagnostics多阵列呼吸芯片及TaqMan阵列芯片[60]。对以上两种检测肺炎链球菌的方法评估发现中等强度的批内一致性，这可能是因为定植状态会导致阳性结果。另外，经FDA认证的梅里埃脑炎/脑膜炎试剂盒检测的是肺炎链球菌的核酸，它是一项多阵列的检测方法，可检测脑脊液中各种各样的病毒及致病菌，但检测肺炎链球菌会出现一定的假阳性率[61]。从血液中直接鉴定链球菌属的系统包括：FDA认证的Verigene革兰阳性培养核酸检测（Nanosphere，Inc.，Northbrook，IL），和FilmArray平台（BioFire Diagnostics）[62-63]。尽管在单微生物培养中，使用这些方法鉴定主要的细菌病原体（包括化脓性链球菌和无乳链球菌）已发表非常有前景的结果，但目前尚无法通过这些测试可靠地从肺炎链球菌组中鉴定出肺炎链球菌和其他链球菌[64]。

用于确认培养所得单克隆菌株是否为肺炎链球菌的核酸探针已有商业化的试剂盒（AccuProbe，Hologic Inc.，Marlborough，MA）。该检测有赖于特异性探针对16S rRNA序列的杂交，但无法区分假肺炎链球菌和肺炎链球菌。这些检测并不用于常规的鉴定程序，但它们可以帮助鉴定具有异常的胆汁溶菌试验和奥普托欣敏感的非典型肺炎链球菌分离株。

七、链球菌分离程序

(一)常规步骤

链球菌一般在血琼脂培养基上生长，因为对其溶血反应进行评估对于鉴定很重要。外源性过氧化物酶通常可以促进链球菌生长。产生较少或者不产过氧化氢的链球菌种，如无乳链球菌，可以在一些普通不含血的非选择培养基上生长。革兰阳性菌的选择性琼脂培养基（如苯乙醇培养基或添加多黏菌素与萘啶酸的哥伦比亚培养基）可促进链球菌的生长。大多数链球菌种的最适孵育温度范围为35～37℃。链球菌为兼性厌氧菌，略高的CO_2（5%）或厌氧环境可利于多数链球菌种的生长。虽然有些链球菌在正常空气中生长良好，5%CO_2孵育培养仍是肺炎链球菌、草绿色链球菌其他菌种培养的推荐方案。

(二)化脓链球菌咽拭子培养的特殊程序

空气中常规使用5%胰酪胨大豆羊血琼脂培养基培养咽拭子标本依然是化脓链球菌急性咽炎诊断的金标准[65]。平板上仅分离到少量化脓链球菌并不能有效鉴别患者是携带者还是急性感染，也可能由于样本采集量不足[66]。菌株不溶血、正常上呼吸道微生物群过度生长或产生毒性细菌代谢产物或底物的消耗，各种因素均常导致假阴性结果，或因为再分离步骤的劳动强度较大而致报告延迟。多项研究分析表明，厌氧或足量CO_2环境下，使用有助于区分β-溶血的选择培养基，可增加化脓链球菌分离率[67]。因为费用的限制，以及获益不明确，这些额外方法一般不推荐用于化脓链球菌分离，但是可以提高其他β-溶血链球菌的分离率。18～24 h孵育后，应检查培养基是否有β-溶血的菌落生长。培养结果如阴性，应继续孵育24 h后再观察。化脓链球菌初步推定可采用杆菌肽敏感试验或PYR活性试验。其他β-溶血链球菌上述2项试验中偶尔会有一项阳性，但两项同时阳性者无。确诊方法包括免疫法检测显示兰氏A群抗原阳性或者MALDI-TOF MS检测。尽管其他链球菌种偶尔含有A群抗原（表23-2），但均无PYR活性[1]。

(三)无乳链球菌筛查特殊步骤

早发性新生儿B群链球菌（无乳链球菌）感染可在分娩期间给予抗生素预防[19]。有效预防感染的重要条件是，分娩前采用可靠手段检测无乳链球菌定植。无乳链球菌筛查应在孕35～37周之间进行。获取阴道下端及直肠拭子（如通过肛门括约肌采集），可用1根拭子或2根不同拭子采集，置于适宜转运培养基运输（含或不含碳的Amies或Stuart转运培养基；见第19章）。当培养菌数下降至一定程度时，室温或4℃条件下，转运培养基上无乳链球菌仍可存活至4天。为降低费

用，阴道与直肠拭子可置于同一转运培养管内，同时培养。拭子应置选择性增菌肉汤中，空气或5% CO_2 条件下，35～37℃培养18～24 h，然后，接种胰蛋白酶大豆琼脂(TSA)平板或无乳链球菌选择培养基上。选择性肉汤培养基有商品化试剂可用，也可自行制备，即在Todd-Hewitt肉汤(THB)中添加萘啶酸(15 μg/ml)及多黏菌素(10 μg/ml)，或在THB中添加萘啶酸(15 μg/ml)及庆大霉素(8 μg/ml)。接种后，35～37℃培养24～48 h，在TSA血平板上检测典型的无乳链球菌菌落(狭窄的β-溶血环)，无乳链球菌鉴定可采用下文中标准方法。选择性培养基观察到无乳链球菌呈橘红色(格拉纳达培养基，Granada medium)，该法特异性高，敏感性好[68]。肉汤培养基增菌后转接到Granada培养基上进一步培养，可增加检出敏感性，该方法特异性高，无需进一步鉴定。但是，不溶血无乳链球菌菌落无法通过这种有赖色素产生的选择性培养基进行鉴定。与传统的选择性培养法相比，NAAT方法检测增菌培养过夜的无乳链球菌，敏感性更高，并且缩短检测时间[69]。最近的CDC指南推荐此方法为替代筛选方案[19]。

八、链球菌鉴定

(一)菌落描述

链球菌菌落通常呈灰或全白色，湿润或有光泽。干燥菌落较少见。不同β-溶血链球菌种，菌落大小相差较大，这有助于鉴别链球菌的不同群。化脓性链球菌群中的β-溶血链球菌(化脓链球菌、无乳链球菌，以及停乳链球菌似马亚种)，经24 h培养后菌落>0.5 mm，与此相比，咽峡炎链球菌群的β-溶血菌落，在同样的孵育时长后呈现针尖样大小的菌落，≤0.5 mm(图23-1)。咽峡炎链球菌群的链球菌种散发出一种特殊的气味，像黄油硬糖(butterscotch)或焦糖(caramel)的气味，推测是该群链球菌种可产生双乙酰。化脓性链球菌β-溶血链球菌菌种中，无乳链球菌生成的菌落最大，但是其溶血环相对较小。不溶血的无乳链球菌可见，外观似肠球菌。

α-溶血链球菌群中，肺炎链球菌的菌落外观，有助于将其与草绿色链球菌其他菌种鉴别。肺炎链球菌可产生荚膜多糖，菌落有光泽，外观湿润。如果有大量的荚膜多糖生成，菌落偏大，黏液型，如血清型3型肺炎链球菌常见此特征。这一表型通常是肺炎链球菌典型特征，但有时也可见于化脓链球菌。肺炎链球菌的另一典型特征为菌落中心脐窝状凹陷，这是由于产自溶素所致。其他草绿色链球菌落外观呈穹形突起，无此特征；但有20%的肺炎链球菌菌株形态与其他的草绿色链球菌群无法区分[70]。牛链球菌群与唾液链球菌群中的菌种呈典型的不溶血灰白色菌落。典型的链球菌菌落形态见图23-1。

(二)鉴定β-溶血链球菌

1. 兰氏抗原免疫试验鉴定β-溶血链球菌 虽然MALDI-TOF MS在很大程度上替代了对于兰氏抗原链球菌分群的需要，但是，商品化兰氏抗原分群血清有售，主要用于β-溶血链球菌的鉴别。人临床样本中分离的β-溶血链球菌如含B群抗原，即为无乳链球菌种，但是，有报道称少见的链球菌种假豕链球菌与灰海豹链球菌与B群抗原有交叉反应[44]，同时CAMP试验可呈阳性。阳性的PYR试验与水解马尿酸试验阴性，有助于鉴别豕链球菌、假豚链球菌与无乳链球菌。对于无乳链球菌的疑难株鉴定，16S RNA核酸检测试验或MALDI-TOF MS会大有裨益。人临床样本分离到小菌落链球菌含F群抗原，则可鉴定为咽峡炎链球菌。如含有A、C或G抗原就必须进一步试验(表23-2)。β-溶血链球菌菌株不与任一种兰氏抗原反应情况比较少见，兰氏抗原阴性反应应进行进一步表型试验或核酸检测法进行鉴定。

2. 采用表型试验与MALDI-TOF MS鉴定β-溶血链球菌 商品化鉴定多种链球菌的产品，包括一系列生理试验(第5章，第20章)。一般来说，这些商品化试剂在鉴定常规分离的致病性链球菌比较可靠，但是，鉴定草绿色链球菌群时可能准确性欠佳。MALDI-TOF鉴定某些链球菌菌种时，也存在一定的限制。对于临床实验室分离的大多数致病性链球菌(如化脓链球菌、无乳链球菌与肺炎链球菌)，血清学试验与推断性生理试验(见下文)还是商品化鉴定系统的较好的替代品。

3. MALDI-TOF MS 近年来采用MALDI-TOF MS进行细菌鉴定是菌种鉴定领域的重大革新。但是MALDI-TOF MS在链球菌菌种鉴定方面还存在一些局限。目前有2种商品化的质谱系统：布鲁克MALDI-TOF MS(the Bruker Daltonics

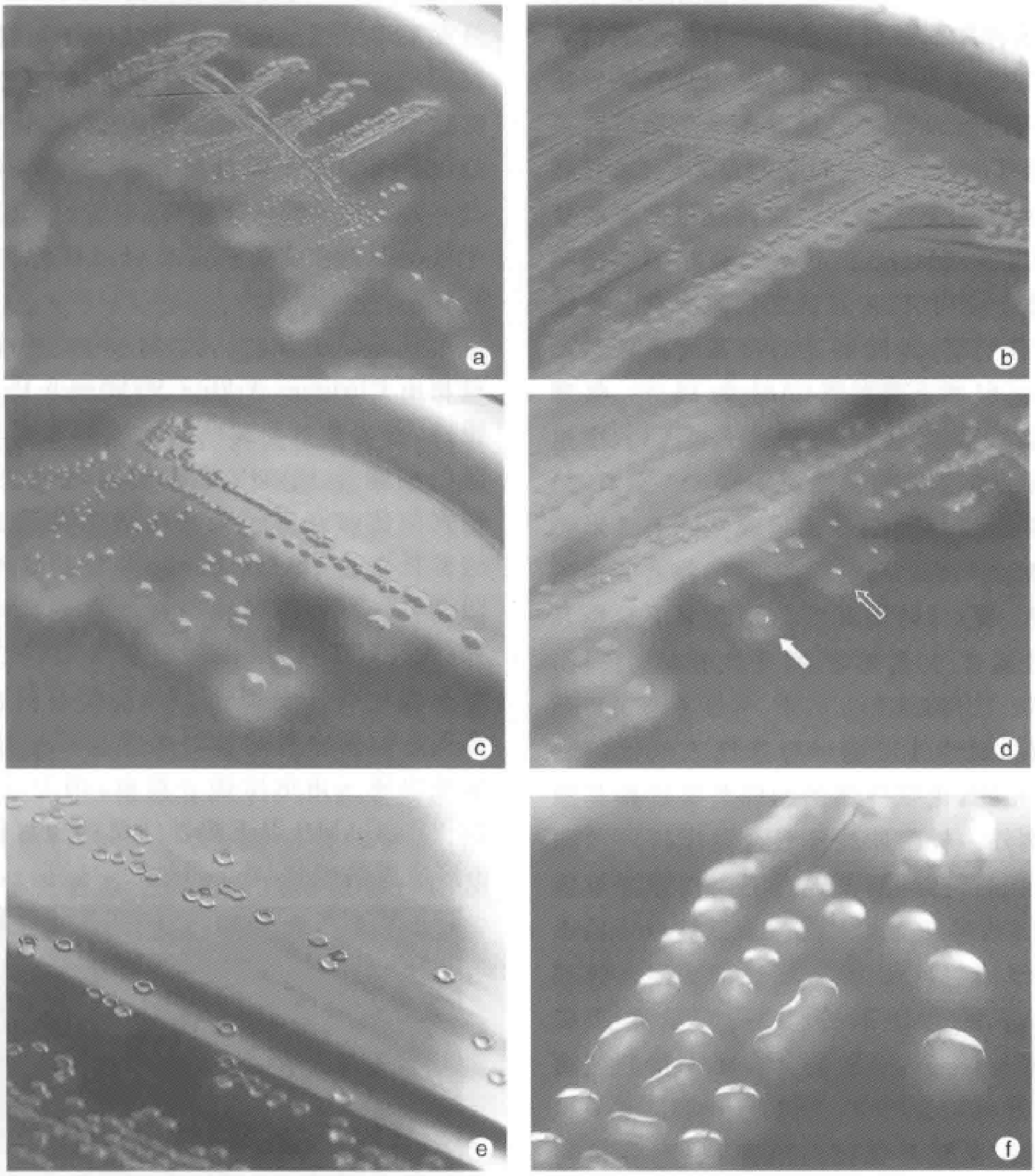


图 23-1 图中所选链球菌菌落形态

a. 化脓链球菌 ATCC12344；b. 无乳链球菌临床分离菌株；c. 停乳链球菌似马亚种（兰氏抗原 G）；d. 咽峡炎链球菌（ATCC12395，虚心箭头）与停乳链球菌似马亚种临床分离株（实心箭头）（注意菌落大小差异）；e. 肺炎链球菌临床分离株（注意菌落的中央凹陷）；f. 肺炎链球菌的临床分离株（注意菌落黏液外观），见彩插

MALDI-TOF MS instrument）与梅立埃的 VITEK MS(e. g. , VITEK MS, bioMérieux)。2 种系统在鉴定 β-溶血链球菌中的化脓链球菌与无乳链球菌，结果与传统试验具有良好的一致性，但对于停乳链球菌，准确鉴定到种的水平还存在问题[71]。其他的问题还包括草绿色链球菌群准确鉴定到种水平还有很多困难[72-73]。Bruker Daltonics 系统第一版的问题是将缓症链球菌或口腔链球菌误鉴定为肺炎链球菌，但是最近的数据库更新，显示区分缓症链球菌，特别是肺炎链球菌的能力显著提高[74]。对于 VITEK MS 设备，有报道称可实现良好的草绿色链球菌鉴定，但将口腔链球菌或缓症链球菌错误鉴定为肺炎链球菌的例子确有发生[74-76]。对于上述 2 种质谱设备，对于草绿色链球菌群的准确鉴定，除肺炎链球菌之外，缓症链球菌群与牛链球菌存在一定问题。总之，MALDI-TOF 对于化脓链球菌、无乳链球菌与肺炎链球菌的菌种鉴定是非常可靠的。

4. PYR 试验 吡咯烷酮氨肽酶（pyrrolidonyl aminopeptidase）常用来区分化脓链球菌与其他 β 溶血链球菌。L-吡咯烷酮-β-萘胺（L-pyrrolidonyl-β-naphthylamide）被该酶水解，生成 β-萘胺，加入

桂醛试剂(cinnamaldehyde)后显红色(第 20 章)。β-溶血链球菌种如海豚链球菌(*S. iniae*)、豕链球菌及假豕链球菌可呈现 PYR 阳性,但这些菌种很少从人临床样本分离。海豚链球菌与化脓链球菌外观相似,但该菌仅在琼脂的穿刺点附近,或在厌氧培养的条件下可见 β-溶血。海豚链球菌不与兰氏链球菌群抗血清反应,在 β-溶血链球菌非常罕见,值得注意。使用 PYR 试验之前重要的是将链球菌与肠球菌鉴别,其他相关的菌属的菌株也可能 PYR 阳性[包括乏养菌属(*Abiotrophia*)、气球菌属(*Aerococcus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、孪生球菌属(*Gemella*)与乳球菌属(*Lactococcus*)]。然而,PYR 阳性的 β-溶血肠球菌呈典型的菌落形态(菌落大,β-溶血环小),与链球菌不同,结合其他表型特征(第 24 章)可与链球菌鉴别。为了避免其他 PYR 阳性菌种(如葡萄球菌)干扰而呈假阳性,做该试验时应使用纯菌落。

5. 杆菌肽敏感性试验 与其他人源性的 β-溶血链球菌相比,化脓链球菌的杆菌肽试验多敏感,仅少数例外。杆菌肽试验联合兰氏抗原检测可用于鉴定化脓链球菌,其他 β-溶血链球菌可含有 A 抗原,但是对杆菌肽耐药。该试验也可用于鉴别化脓链球菌与其他 PYR 阳性的 β-溶血链球菌(如海豚链球菌与豕链球菌)。羊血平皿(sheep blood agar, SBA)密涂 3 或 4 个待测纯培养菌株的菌落,贴上杆菌肽纸片(0.04 U)。关键一点是在 SBA 上转种菌落进行该试验,直接将杆菌肽纸片贴在原始平皿上敏感性差。35℃、5%CO_2 条件下孵育过夜,一旦纸片周围有抑菌环,即解释为敏感。应引起注意的是有杆菌肽耐药的化脓链球菌的报道,在几个欧洲国家均观察到一些杆菌肽耐药的化脓链球菌[77-78]。

6. VP 试验 伏-波试验(Voges-Proskauer, VP)可检测葡萄糖发酵生成的 3-羟基丁酮。经典的 VP 反应用来鉴别肠道菌,用于链球菌鉴定的的 VP 经过改进。咽峡炎链球菌群的小菌落 β-溶血链球菌 VP 试验阳性,可借此与含有同类兰氏抗原(A、C 或 G)的大菌落 β-溶血链球菌相鉴别。缓症链球菌群 VP 试验阴性。Fcaklam 描述了改进 VP 试验。将整个平皿生长的链球菌菌落接种到 2 ml VP 肉汤,35℃下孵育 6 h。随后加入 5% α-萘酚与 40%KOH,剧烈振荡反应管几秒钟,然后放在室温条件下孵育 30 min。阳性试验可生成粉红-红色,即为二乙酰与胍反应产物。

7. β-葡糖醛酸糖苷酶(BGUR)试验 停乳链球菌似马亚种与咽峡炎链球菌群小菌落链球菌含有相同的兰氏抗原 C 或 G,检测 β-葡萄醛酸糖苷酶(BGUR)活性可以区分,后者为 BGUR 阴性。已有商品化试剂快速检测 BGUR 反应。有一种用于替代上述方法的快速荧光试验将在第 20 章进行详述。

8. CAMP 试验 CAMP 因子反应于 1944 年最初由 Christie、Atkins 及 Munch-Petersen 最先报道,指金黄色葡萄球菌的 β-溶血素与无乳链球菌的细胞外 CAMP 因子协同增强红细胞溶解。绝大多数(>98%)无乳链球菌菌落含有 *cfb* 基因并且表达 CAMP 因子,但是的确发现 CAMP 阴性突变。待测菌株与金黄色葡萄球菌标准菌株(ATCC25923),在羊血平皿上成 90°角画线。血平板在空气中,36℃±1℃孵育过夜。如果在金黄色葡萄球菌的 β-溶血素与 CAMP 因子扩散区域出现三角形增强 β-溶血,则为试验阳性(图 23-2)。CAMP 因子阳性的菌株也可能采用含有 β-溶血素的纸片(Remel Inc., Lenexa, KS)或者

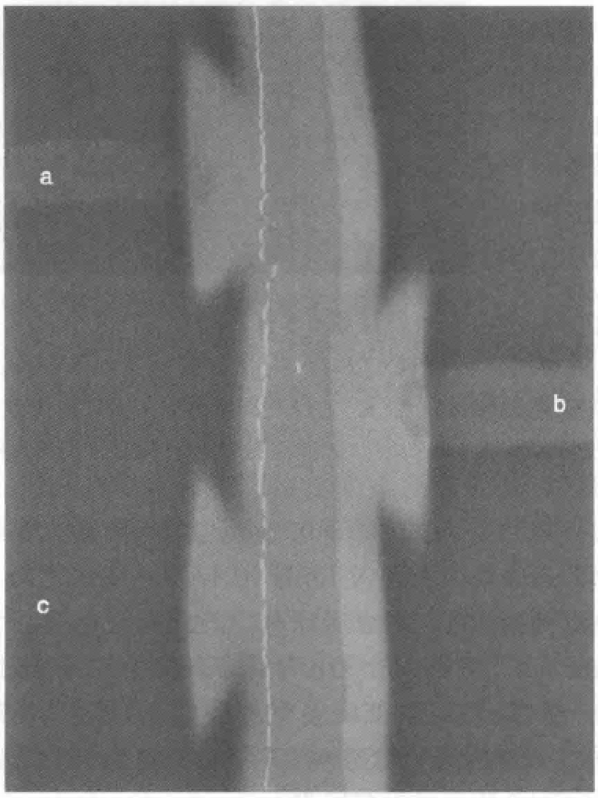


图 23-2 CAMP 试验。金黄色葡萄球菌 β-溶血素溶血区域呈箭头状溶血增强区。(a)弱 β-溶血的无乳链球菌临床分离株。(b)β-溶血的无乳链球菌株 O90R。(c)不溶血的无乳链球菌菌株 R268,见彩插

快速 CAMP 因子斑点法进行检测[79]。尽管许多化脓链球菌包含 CAMP 因子基因的同源染色体，除了无乳链球菌与一些罕见的海豚链球菌、豕链球菌、假豚链球菌外，许多 β-溶血链球菌的上述 CAMP 因子试验均为阴性。某些革兰阳性杆菌也呈 CAMP 因子阳性，包括棒杆菌（corynebacteria）与单核细胞性李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）。

9. 马尿酸水解试验（hippurate hydrolysis test） 马尿酸水解试验，可作为初步鉴定无乳链球菌的替代试验。该试验有快速检测方法，也曾用于鉴定弯曲菌（campylobacters），见第 20 章。无乳链球菌之外的链球菌，特别是草绿色链球菌群，也可能为马尿酸水解试验阳性。

（三）肺炎链球菌与草绿色链球菌群鉴定

非肺炎链球菌的草绿色链球菌群正确鉴定到种，还面临很大的挑战。近年来分类的变化，以及鉴定出的新型链球菌种，使得鉴定越来越复杂。草绿色链球菌包括 α-溶血链球菌，不溶血链球菌（唾液链球菌群与牛链球菌群），以及 β-溶血链球菌群（咽峡炎链球菌群）的菌株。所有的草绿色链球菌群均为亮胺酸氨肽酶（leucine aminopeptidase）试验阳性，PYR 试验阴性。传统的微生物试验在该群种水平鉴定存在一定局限，但是有助于将分离的链球菌准确鉴定至群水平（表 23-3）。需要强调的一点是，大多数临床实验室使用目前配套表型试验，必须尽量将草绿色链球菌鉴定到群水平，而不是种水平。

API 试验可将草绿色链球菌鉴定到种的水平。该群多数菌种鉴定准确率相当不错，但是有些菌种尚未纳入鉴定数据库中，导致种水平分类错误。常规临床工作中，对 API 评估的试验结果更不容乐观[80]。目前，更多使用全自动鉴定系统鉴定链球菌，如 VITEK 2 或 MALDI-TOF MS 设备。与 16S rRNA 基因测序法相比，鉴定到链球菌群水平的一致率仅有 75%[81]。在另一项研究中，待测菌株正确鉴定到种水平的仅为 55%[82]。与此相似，上文中已经讨论过，MALDI-TOF MS 方法将草绿色链球菌群正确鉴定到种水平还存在问题。总之，草绿色链球菌的表型与自动化菌种鉴定，还存在很多挑战。

分子鉴定方法可能是传统表型鉴定方案之外的替代方案。最常用的分子鉴定方法是 16S rRNA 基因测序，该方法在鉴定一些链球菌种时，包括缓症链球菌、口腔链球菌及肺炎链球菌，尚不能准确鉴定到种的水平。上述链球菌的 16S rRNA 基因序列有超过 99%的一致率[2]。锰依赖性过氧化物歧化酶（manganese-dependent superoxide dismutase）编码基因 *sodA* 测序可能是更可靠的分子鉴定方法[82-83]。与 16S rRNA 测序相比，*sodA* 测序可以鉴别缓症链球菌（*S. mitis*）、口腔链球菌（*S. oralis*）及肺炎链球菌（*S. pneumoniae*），并可将草绿色链球菌群准确鉴定到种。

属于草绿色链球菌群的菌种表型描述见表 23-1，生理特性见表 23-3。

表 23-3 主要链球菌群的表型特征[a]

链球菌群	精氨酸水解	七叶苷	甘露醇	山梨醇	尿素水解	VP
缓症链球菌[b]	V	V	—	V	—	—
咽峡炎链球菌[c]	+	+	—	—	—	+
变异链球菌[d]	—	+	+	+	—	+
唾液链球菌[e]	—	V	—	—	V	+
牛链球菌[f]	—	V	V	—	—	+

注：[a]+. 阳性；—. 阴性；V. 不定。[b]缓症链球菌群包含的链球菌种包括澳大利亚链球菌、嵴链球菌、戈登链球菌、婴儿链球菌、马赛链球菌、缓症链球菌、口腔链球菌 dentisani 亚种、口腔链球菌口腔亚种、口腔链球菌 *tigurinus* 亚种、副血链球菌、泛口腔链球菌、肺炎链球菌、假肺炎链球菌、鲁布纳链球菌、血链球菌、中国链球菌、副血链球菌、戈登链球菌与嵴链球菌，精氨酸水解试验阳性，该群的其他菌种该试验为阴性。[c]咽峡炎链球菌、星座链球菌与中间链球菌均属于咽峡炎链球菌群。[d]缓症链球菌群包括变异链球菌与表兄链球菌，以及下列很少从人分离出的链球菌：仓鼠链球菌、鼠链球菌与道恩链球菌。[e]唾液链球菌群包括唾液链球菌唾液亚群、前庭链球菌与唾液链球菌嗜热亚群。尿素水解试验唾液链球菌唾液亚群结果不确定，前庭链球菌为阳性，而唾液链球菌嗜热亚群为阴性。[f]牛链球菌群包括马肠链球菌、解没食子酸链球菌解没食子酸亚群、解没食子酸链球菌 pasteurianus 亚群、解没食子酸链球菌 macedonicus 亚群，以及婴儿链球菌婴儿亚群、婴儿链球菌结肠亚群、与非解乳糖链球菌。其中解没食子酸链球菌解没食子酸亚群甘露醇酸化试验阳性，其他的牛链球菌群该试验阴性

1. 缓症链球菌群(*S. mitis* group) 该链球菌群绝大多数为α-溶血链球菌，其中包括一些有明确临床意义的链球菌种，以及一些临床资料罕见或缺如的链球菌种。缓症链球菌群的各菌种的表型特征中，缓症链球菌的胞外多糖生成试验阴性，但是对于口腔链球菌，该试验结果不定。该试验特征与菌株形态相关，许多口腔链球菌的菌株呈光滑菌落，缓症链球菌的菌落粗糙干燥。

2. 咽峡炎链球菌群(*S. anginosus* group) 小菌落的咽峡炎链球菌群内的菌株在血平皿上可表现为不溶血、α-溶血或β-溶血，菌种间也可能存在差别。星座链球菌常为β-溶血，中间链球菌的大多数菌株为不溶血。对多种菌株而言，CO_2 环境下生长更好，有些菌株甚至需要厌氧条件。咽峡炎链球菌与星座链球菌的菌株可包含兰氏抗原A、C、F或G。大多数的星座链球菌或中间链球菌的菌株可与F族抗原反应，或者不与任何抗原反应，无法分群。

星座链球菌种进一步分为2个亚种，星座链球菌星座亚种、星座链球菌咽炎亚种及星座链球菌 *viborgensis* 亚种。星座链球菌星座亚种与星座链球菌咽炎亚种表型存在差异，常含有兰氏C族抗原，β-溶血，与咽峡炎密切相关。咽峡炎链球菌群的详细表型特征见表23-4[1,84-85]。

表23-4 唾液链球菌群内链球菌种的表型特征[a]

试验	咽峡炎链球菌	星座链球菌[b]	中间链球菌
β-D-岩藻糖苷酶	−	−	+
β-N-乙酰葡糖胺糖苷酶	−	−	+
β-N-乙酰半乳糖苷酶	−	−	+
神经氨酸酶	−	−	+
α-D-葡糖苷酶	V	+	+
β-D-葡糖苷酶	+	−	V
β-D-半乳糖苷酶	V	−	+
苷杏仁苷(酸化)	+	V	V
甘露醇(酸化)	V	−	−
山梨醇(酸化)	−	−	−
乳糖(酸化)	+	V	+
精氨酸水解	+	+	+
七叶苷水解	+	V	+
VP[c]	+	+	+
尿素酶	−	−	−

注：[a]+. 阳性；−. 阴性；V. 不定；资料来源于Summanen[84]、Facklam[1]与Whiley[85]。[b]与星座链球菌星座亚种不同，星座链球菌咽炎亚种β-D-岩藻糖苷酶、β-D-乙酰葡糖苷酸糖苷酶、β-D-乙酰半乳糖苷酶与β-D-葡糖苷酶试验均为阳性。[c]VP试验(糖发酵生成3-羟基-2-丁酮)

3. 变异链球菌群(*S. mutans* group) 变异链球菌群中，变异链球菌与表兄链球菌常来源于人类，其他的菌种很少自人体检出(表23-1)，多为动物的致病源。此类菌种主要特征为分解蔗糖，产生细胞外多糖，如需验证该特征，可将待测菌接种在含有蔗糖的琼脂上培养，或者检测细菌是否具有分解多种碳水化合物产酸的能力。变异链球菌菌株可呈现出非典型的链球菌的外形，在固体培养基或酸性条件下的肉汤培养时，形成短杆状。血平皿上生成的菌落常较硬，附着平皿，呈α-溶血环。厌氧环境下培养，部分菌株为β-溶血。表兄链球菌大多数无溶血，或偶尔呈α-溶血。在蔗糖培养基上，该菌菌落粗糙(上霜的玻璃样外观)，呈堆积状，含有液体的葡聚体环绕在菌落周围。

4. 唾液链球菌群(*S. salivarius* group) 唾液链球菌群的菌株在血平皿上多呈非溶血或α-溶血。在含蔗糖的平皿上，因产生细胞外多糖，可形成较大黏液样或较硬菌落。大多数的唾液链球菌与兰氏抗原K群抗血清反应。唾液链球菌群的菌株也可能与链球菌D群抗血清反应。但目前尚不清楚是否这些菌株具有D族抗原，还是产生了非特异性的交叉反应。前庭链球菌为α-溶血，在含蔗糖的平皿上不能生成细胞外多糖，有助于将其与唾液链球菌相鉴别。唾液链球菌嗜热亚种可见于奶制品中，还没有从临床样本中分离过。

5. 牛链球菌群(*S. bovis* group) 属于牛链球菌群的链球菌种均属于非肠球菌D族链球菌，PYR试验阴性。这些菌多数可在胆汁七叶苷

(bile esculin)平皿上生长，不能在 6.5%NaCl 中生长。血平皿上，菌落呈非溶血或 α-溶血。牛链球菌群与变异链球菌菌株表型特点相似，如均可生成葡聚糖、发酵甘露醇、在胆汁七叶苷平皿上生长。然而，牛链球菌群不发酵山梨糖醇(sorbitol)。解没食子酸链球菌解没食子酸亚群与婴儿链球菌结肠亚群，可发酵淀粉或糖原，反应典型，与兰氏 D 族链球菌抗原反应阳性，这些特征可以与解没食子酸链球菌巴氏亚群鉴别。该群链球菌不同亚种的详细表型特征以及更正说明的文献已经发表。鉴定该群的亚种，采用下列表型试验非常重要，β-葡糖苷酶(β-glucuronidase)、α-与 β-半乳糖苷酶(α-and β-galactosidase)、β-甘露糖苷酶(β-mannosidase)、淀粉、糖原、菊糖及甘露醇等产酸试验。如前所述，以前称为牛链球菌的菌株，现在属于牛链球菌群下的不同菌种。

6. 生理学试验(physiologic tests)

(1)奥普托欣试验(optochin test)：大多数肺炎链球菌菌株对奥普托欣敏感。取纯培养的肺炎链球菌数个菌株，接种于羊血平皿，然后贴奥普托欣纸片。奥普托欣试验应将培养皿放在 35～36℃，5%CO_2 环境下培养过夜，因为高达 8%肺炎链球菌在空气中不生长。肺炎链球菌菌株抑菌圈≥14 mm，其中纸片直径为 6 mm(含 5 μg 奥普托欣)，或者抑菌圈≥16 mm，其中纸片直径为 10 mm(含 5 μg 奥普托欣)。在 5%CO_2 下培养该试验特异性较高[30,70]。奥普托欣耐药的肺炎链球菌及敏感的缓症链球菌菌株(特别是在空气条件下进行此试验)均有报道。奥普托欣试验可能遗漏 4%～11%胆汁溶解试验阳性的肺炎链球菌菌株[30,70]，因此，抑菌圈较小的肺炎链球菌菌株(使用 6 mm 纸片，抑制圈为 9～13 mm)应补充其他试验(如胆汁溶解试验或基因检测)以明确鉴定链球菌菌种。

样本原始培养平板直接贴奥普托欣纸片，可以快速鉴定疑似菌落，但是在混合细菌生长时，可能遗漏肺炎链球菌。因此，混合细菌生长时应当转种分纯，重复奥普托欣敏感试验，或者补充试验(如胆汁溶解试验)。

(2)胆汁溶解试验(bile solubility test)：胆汁溶解试验可在试管中操作，也可以将试剂直接滴在平皿上。采用试管法时，纯培养菌落的盐水混悬液调成 0.5～1.0 麦氏单位，取 0.5 ml 混悬液加入小试管。细菌混悬液与 0.5 ml 10%脱氧胆酸钠(胆汁)混匀，35℃条件下孵育。待测菌应同时制备包含 0.5 ml 细菌混悬液加 0.5 ml 盐水的对照管。胆汁溶解试验阳性结果为 3 h 内胆汁混悬液变清亮；孵育后 5～15 min，混悬液开始变清亮，可鉴定该菌株为肺炎链球菌。最近发表的报道，报告了一种快速光密度试管方法，孵育 10 min 后可检测[72]。如采用平皿法，1 滴 10%脱氧胆酸钠直接滴在一个待测菌落上，将平皿在 35℃，空气孵育 15～30 min。重要一点，是将平皿保持在水平位置，以避免试剂将待测菌落冲掉。肺炎链球菌菌落可消失，或者显示有削平菌落外形，而其他草绿色链球菌没有变化。最近一项全面评价试验表明，与奥普托欣敏感试验相比，胆汁溶解试验显示出良好的敏感性与特异性[70]。

(3)胆汁七叶苷试验(bile esculin test)：胆汁七叶苷平皿或斜面培养基应接种 1～3 个待测菌落，35℃空气中孵育 48 h。在添加了 4%牛胆汁(相当于 40%胆汁)的培养基中，接种标准化 10^6 CFU 菌量，可达最佳试验结果[86]。平板培养基明显变黑色，或者琼脂斜面至少有一半变黑色，提示待测菌株为牛链球菌群或肠球菌。偶尔其他草绿色链球菌群该试验也呈阳性，或者呈弱阳性，该现象难以解释。严重感染(如心内膜炎)患者中分离到的菌株，应更全面鉴定其特征。

(4)精氨酸水解(arginine hydrolysis)：精氨酸水解是鉴定草绿色链球菌的一个关键反应。为检测精氨酸双水解酶的活性，在含有精氨酸的 Moeller 脱羟酶肉汤中接种待测菌株，肉汤上覆盖矿物油，35～37℃孵育，不超过 7 天，具体见第 20 章。

(5)尿素水解(urea hydrolysis)、七叶苷水解(esculin hydrolysis)和 VP 试验：待测菌株接种于科氏尿素琼脂(Christensen's urea agar)(Becton Dickinson 有售，其他途径也可获得)，35℃厌氧条件下培养，不超过 7 天。逐渐出现粉红色提示阳性反应。另一种方法是将无琼脂的科氏培养液滴加到微量滴定板的孔内，接种待测菌株后，上覆一层矿物油，再进行培养。

为检测七叶苷水解活性，七叶苷琼脂斜面(Becton Dickinson 有商品化试剂，其他途径也可购买)接种待测菌株，培养最长不超过 7 天。培养基变成黑色提示阳性反应；无颜色变化提示七叶苷水解试验阴性。VP 试验可按上述操作，用于鉴定 β-溶血链球菌。标准的 VP 试验操作方法，需要

延长培养时间，具体见第 20 章描述。

(6)透明质酸酶生成(hyaluronidase production)：透明质酸酶活性可通过添加了 2 mg/L 透明质酸钠的脑心浸出液琼脂平皿检测。待测菌株穿刺接种于平皿培养基，37℃厌氧培养过夜，用 2 mol/L 乙酸浸没培养基，如在穿刺点周围出现透明带，提示透明质酸酶有活性，为阳性结果。也可使用微量滴定板进行定量检测，确认透明质酸活性[87]。

(7)胞外多糖生成(production of extracellular polysaccharide)：待测菌株在含蔗糖琼脂平皿分离培养，形成单个菌落。2 种最常用的培养基包括：①含有 0.001%(wt/vol)亚碲酸钾的缓症-唾液链球菌(mitis-salivarius)琼脂；②胰蛋白胨酵母胱氨酸(tryptone-yeast-cystine)琼脂，37℃条件下厌氧培养 5 天。

九、链球菌分型方法

多数情况下，对链球菌分型与临床或治疗无关。该工作常在参照实验室开展，用于做流行病学研究及对疫苗有效性进行评估。经典的抗体分型方法依据荚膜血清型与表面蛋白的抗体，但是越来越多的分子生物学分型方法已经得以应用，因为此类方法不需要特殊技术，也无须保存一些罕用的试剂，如大量配套的抗体。分子分型与抗体分型相比另一个优势是 DNA 序列与培养条件及基因表达关系不大。许多链球菌种的不同克隆株鉴别，均已建立了脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis，PFGE)与多位点序列分型(multilocus sequence typing，MLST)方法[88]。

肺炎链球菌包含 90 多种不同抗原的荚膜血清型，采用 Neufeld 试验可以检测(Quellung reaction)，该方法还是流行病学研究的金标准。肺炎链球菌纯培养可在新制备的 5%羊血平皿或 10%马血平皿上进行，35～37℃，5% CO_2 孵育 18～24 h。取少量生长细菌(少于 10 μl 菌环量)，复悬于一滴磷酸盐缓冲液或生理盐水(麦氏标准 0.5)。取几毫升盐水悬浮液与等量特异性肺炎链球菌兔抗血清在玻片上混匀。随后，样本可采用相差显微镜(放大倍数，×1000；油镜下)[89]观察荚膜肿胀(菌体周围的空白区)情况，并进行评估。依照同样原理，现有商品化的抗血清试剂盒使用棋盘网格法，盒内含一组抗血清，可快速鉴定肺炎链球菌血清型。另有一种已研发出的快速肺炎链球菌抗原检测试验，采用配套抗血清结合乳胶颗粒[90]。因为菌株差异性，推荐采用 Neufeld Quellung 反应对结果进行确认。此外，在过去数年中已研发出可检测肺炎链球菌血清型 PCR 方法[91-92]。PFGE 或 MLST 分型方案已应用于肺炎链球菌研究中，用于单独克隆株(individual clone)的鉴定。

无乳链球菌现有 10 种不同抗体确认的荚膜多糖(capsular polysaccharides)型别(Ⅰa，Ⅰb 及 Ⅱ～Ⅸ)。采用荚膜表达优化的方法，可提高分型菌株比率[93]。除采用抗体检测荚膜血清型外，使用 PCR 或 DNA 测序技术也可以鉴定荚膜血清型[94-95]。无乳链球菌的单独克隆株可采用 MLST 或 PFGE 方法进行鉴定。

化脓链球菌传统分型是基于表面表达 T 与 M 蛋白的抗原特异性。胰蛋白酶抵抗 T 蛋白(trypsin-resistant T protein)是菌毛结构的一部分[96]。T 蛋白的分型可采用凝集法，有商品化血清试验试剂盒包括 20 种认可的抗 T 血清。M 蛋白为化脓链球菌主要的抗吞噬毒力因子[97]。编码上述强保护性抗原的基因的 N-末端序列变异是化脓链球菌沉淀分型方法(precipitation typing system)的基础。目前，共有 83 种 M 血清型得以确认，国际上也予以认可，其血清学特点各有不同，在兰氏血清型分类中被命名为 M1～M93[137]。

分子生物学分型方法主要依据编码 M 蛋白的氨基酸末端的核苷酸序列，*emm* 基因序列。*emm* 编码 M 蛋白，并与兰氏 M 血清型相对应。这种方法可以命名某一已确认的 M 蛋白基因序列，也很方便地鉴定新 *emm* 基因序列，代表着目前化脓链球菌分型的标准[98]。美国 CDC 网站(http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm)上包含约 350 种 *emm* 基因序列的大量数据库，主要来源于兰氏血清分型的菌株，还包括 C、G 与 L 群的 β-溶血链球菌。最近已经采用了用于化脓链球菌 *emm* 分型的，基于与功能相关的 M 蛋白分群改良方案[99]。

MLST 方案也可用于化脓链球菌分型。人群基因特征研究显示，在几十年间和(或)从各大洲获得的 *emm* 分型与 MLST 分型之间存在稳定的关系[100]。

十、血清学试验

检测链球菌抗体有助于诊断链球菌感染疾

病，如急性风湿热或肾小球肾炎[101]。抗体滴度4倍增高是之前出现链球菌感染的明确依据。很多因素影响抗体水平，包括链球菌感染的部位、首发感染时间、患者年龄、既往感染史、抗生素治疗情况，以及有无其他合并症[102]。应用最广泛的抗体为抗链球菌溶血素O抗体(anti-ASO)与抗链道酶B抗体(anti-DNase B)。

抗ASO抗体在链球菌感染后3～6周达峰值。链球菌引起上呼吸道感染后ASO反应性通常会增高，但是化脓链球菌所致脓皮病不会引发强烈的ASO反应。停乳链球菌似马亚种也可以生成链球菌溶血素O，因此ASO滴度升高对诊断化脓链球菌感染特异性不高。

链球菌生成4种链道酶(DNase)，对于链道酶B的宿主反应一致性较高。抗-DNase B滴度在链球菌感染后6～8周不一定达峰浓度，但是保持高滴度的时间比ASO更长，而且在确诊之前曾有链球菌皮肤感染时，抗-DNase B也比ASO更加可靠。此外，仅有80%～85%风湿热患者ASO滴度增高，增加抗DNase B滴度检验对于诊断更有帮助。

美国2～12岁的儿童，因为经常接触化脓链球菌，ASO与抗-DNase B的滴度普遍增高。ASO与抗-DNase B的滴度几何均数(中位数)分为89 Todd单位与112 Todd单位，正常值上限分别为240 Todd单位(ASO)与640 Todd单位(抗-DNAse B)[103]。链球菌感染后及时治疗可降低抗体滴度，但不能阻止抗体产生。链球菌携带者的抗体滴度不会升高。

十一、抗菌药物敏感性

(一)β-溶血链球菌

青霉素是化脓链球菌感染经验治疗的首选抗生素，与肺炎链球菌及其他α-溶血链球菌相比，化脓链球菌对青霉素均敏感。报道所称的化脓链球菌菌株青霉素敏感性降低，尚未得到参考实验室的证实。但是，对于无乳链球菌，情况并非如此，在亚洲与美国均报道出现青霉素G敏感性下降的无乳链球菌，这些菌株检出青霉素结合蛋白(penicillin binding proteins, PBPs) Pbp2x[104-105]。患者疑似或明确对青霉素过敏，此时，大环内酯类抗生素和克林霉素经常作为替代治疗方案。化脓链球菌与无乳链球菌菌株大环内酯类的耐药率在北美、亚洲与欧洲均有增高[106]。大环内酯类的耐药率与临床使用有关，而且区域性差异经常是因为该药不同地区使用情况不同所致。在美国，无乳链球菌克林霉素耐药率28.9%，红霉素的耐药率49.5%。目前尚未发现有糖肽类敏感率降低化脓链球菌，但在侵袭性感染的极少的无乳链球菌菌株中含有*vanG*耐药基因[107-108]。因为化脓链球菌对于青霉素均敏感，使用青霉素治疗化脓链球菌与无乳链球菌感染时，如仅考虑临床需求，无须开展青霉素药敏或者其他β-内酰酶试验。目前，虽然报道有对青霉素敏感降低的罕见无乳链球菌，但是尚不足更改上述建议，当然，如果此类不敏感菌株不断增加，也可能建议开展药敏试验。大环内酯类的药敏试验应使用红霉素，因为检测红霉素可预测阿奇霉素、克拉霉素，以及妥布霉素的耐药与敏感性。如美国CDC指南特别强调[19]，青霉素严重过敏的孕妇，一旦分离出无乳链球菌，应检测红霉素与克林霉素是否耐药。药敏试验应包括结构性及诱导性克林霉素耐药，首选双纸片扩散法(D-抑菌圈试验)。为与最近CLSI推荐的变化保持一致，结果报告时仅报告克林霉素的耐药结果。

链球菌氟喹诺酮类抗菌药物耐药引起更多的关注，此类抗菌药物不应作为化脓链球菌感染的一线药物。*gyrA*与*parC*基因点突变是氟喹诺酮耐药的主要原因[109]。在亚洲，有研究发现无乳链球菌对于喹诺酮类耐药[110]。β-溶血链球菌对于利奈唑胺与达托霉素是敏感的[111]，但是尚无研究明确其临床有效性与耐药进展的情况。

(二)肺炎链球菌与草绿色链球菌群

考虑到肺炎链球菌与其他α-溶血链球菌青霉素耐药变化，许多国家不再将青霉素作为其经验治疗的首选抗生素。仅当肺炎链球菌与其他α-溶血链球菌青霉素药敏试验显示敏感时，才优先选择青霉素。肺炎链球菌青霉素耐药是因PBPs改变所致。2007年，在美国大约5%肺炎链球菌对青霉素不敏感(http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/surv-reports.html)。CLSI标准中定义的非脑膜炎来源的肺炎链球菌菌株的判断折点[≤2 μg/ml，敏感(S)；4～8 μg/ml，中介(I)；≥8 μg/ml，耐药(R)]发生变化，使得肺炎链球菌的不敏感率降至低于10%[112]。2015年4.3%的肺炎链球菌株对青霉素不敏感(http://www.cdc.

gov/abcs/reports-findings/survreports/spneu15.pdf)。该菌青霉素药敏可采用 1 μg 苯唑西林进行纸片扩散试验。根据目前 CLSI 批南，一旦苯唑西林抑菌圈直径≤19 mm，提示青霉素敏感性降低，应使用 MIC 法确认耐药。肺炎链球菌对于其他β-内酰类抗生素的药敏情况，推荐使用 MIC 法检测。肺炎链球菌感染应该根据当前的指南进行治疗[113]。根据临床情况，治疗的选择包括青霉素、广谱头孢菌素、大环内酯类、氟喹诺酮类及万古霉素。此外，20 世纪 90 年代在美国收集的血培养中草绿色链球菌菌株，有 1/3 以上对青霉素不敏感[114]。缓症链球菌与唾液链球菌青霉素耐药菌率有所增高，但是咽峡炎链球菌群未见明显增加。由于过敏及其他原因，缓症链球菌和其他类型的草绿色链球菌经常使用新型抗生素治疗。但是，当使用达托霉素治疗时，缓症链球菌菌株可迅速产生耐药性[115]。在美国，直至 20 世纪 80 年代末，大环内酯类抗生素几乎均对肺炎链球菌敏感，但在最近发表的研究中，大环内酯类耐药率高达 29%[116]。

氟喹诺酮类用于治疗肺炎链球菌感染不断增加，随之而来的是氟喹诺酮耐药的肺炎链球菌菌株数增高。此类耐药为阶梯式出现，是因为 DNA 拓扑异构酶Ⅳ(*parC*)和(或)DNA 旋转酶(*gyrA*)突变所致。根据最近活跃细菌核心监测(Active Bacterial Core Surveillance，ABCs)的数据，氟喹诺酮整体耐药率保持在 1% 以下(http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/spneu15.pdf)，最近几年的耐药菌株的增加，提示对之密切监测的重要性。因菌株耐药所致的左氧氟沙星临床治疗失败已见报道[117]。万古霉素耐药的肺炎链球菌未见报道。然而，有报道称从牛链球菌群和咽峡炎链球菌群分离出了万古霉素耐药的草绿色链球菌[108,118]。

十二、结果评估、解释和临床报告

化脓性链球菌群是重要的人体致病菌。临床样本中及时鉴定此类菌种，对于充分治疗感染与减少传播很关键。化脓链球菌所致的扁桃体炎依旧是儿童与青少年人群重要的疾病。使用快速抗原检测、NAATs 或培养细菌，以尽量减少不合理地应用抗生素治疗病毒性咽炎。血清学试验常用于疑似链球菌感染后遗症的病例诊断。然而，准确的鉴定与报告应该不仅局限于化脓链球菌，因为报道表明停乳链球菌似马亚种(人 C 与 G 链球菌)可引起咽炎，有些感染也可引起非化脓性后遗症。从这个意义上说，正确地鉴别上述病原菌与咽峡炎链球菌群中的小菌落 β-溶血链球菌种非常重要，后者是口咽部正常菌群的重要组成部分。因为加强了产前筛查与围生期抗生素预防，侵入性新生儿无乳链球菌感染呈下降趋势，但是有报道称成人患者中无乳链球菌的感染率增加[20]。因此，对该菌的全面鉴定与报告不应该仅局限于孕期妇女的筛查拭子与新生儿人群。同理，对于 β-溶血链球菌，报告克林霉素敏感之前，应开展诱导克林霉素耐药的检测。

尽管肺炎链球菌常见在呼吸道样本中定植，该菌应与其他的草绿色链球菌明确鉴别，并报告临床。细菌分离培养依然是肺炎链球菌所致肺炎、脓毒症及脑膜炎的诊断最重要依据。为了治疗初始就使用适当的抗生素，必须对所有菌株进行药敏试验。对于脑脊液样本与非脑脊液样本分离的肺炎链球菌菌株，必须保证 β-内酰胺类抗生素的折点报告准确性。如果在留取微生物检测样本前已经开始抗生素治疗，使用尿抗原试验或核酸检测技术有助于正确鉴定致病原，对于侵入性感染而言尤需如此。

目前对于草绿色链球菌群，严峻的挑战还是在于准确鉴定及从正常生理微生物菌群中鉴别致病菌。引起脓腔、心内膜炎及粒细胞缺乏症患者严重感染的草绿色链球菌，应鉴定到群或种的水平。对于导致感染性心内膜炎的草绿色链球菌，青霉素的 MIC 可影响其治疗方案。许多缓症链球菌菌株对于青霉素不敏感。解没食子酸链球菌解没食子酸亚种与胃肠道恶性肿瘤相关，同时考虑到牛链球菌群分类学的变化，所涉新菌种名称在微生物报告时，应包括其牛链球菌群信息[119]。

参考文献请扫二维码查阅

第24章　肠球菌属

LÚCIA MARTINS TEIXEIRA, MARIA DA GLÓRIA SIQUEIRA CARVALHO,
RICHARD R. FACKLAM, PATRICIA LYNN SHEWMAKER

（李敏　译；鲁炳怀、倪语星　审校）

一、分类

肠球菌属包括与链球菌属有历史联系的微生物，因为它们最初被认为是链球菌属中的一个独特分支，包括大多数D群血清型链球菌[1-3]。自从引入分子方法以来，分类学发生了很大的变化，首先是链球菌属的分裂，1984年肠球菌被确认为一个单独的属[4]。确实，随着基于16S rRNA基因序列比较的系统进化分析的发展，发现肠球菌属的成员与某些其他属的亲缘关系比与链球菌和乳球菌的亲属关系更密切，它们与另一个属的表型相关[1-3,5]。这些观察最终提出了将肠球菌属与*Melissococcus*，*Tetragenococcus*，*Vagococcus*一起归于新命名的科（Enterococcaceae fam. nov.），该科属于厚壁菌门，芽胞杆菌纲及乳杆菌目[6-7]。最近，有人提出将另外2个属*Catellicoccus*和*Pilibacter*放在该科[3]。人们对这些微生物之间的系统发育关系的了解还在不断更新，并且随着更强大的系统发育工具的问世及被更广泛地应用，当前的分类可能会进行其他修订。

与肠球菌科的其他成员一样，肠球菌属由革兰阳性，触酶阴性细菌组成，其鸟嘌呤加胞嘧啶（G+C，<50 mol%）含量低。肠球菌属是该科的主要成员，因为它们更常见且分布广泛，并且与多种来源相关。这些特性可以部分地解释这些微生物之间的相对异质性，从而产生一个概念，肠球菌属既不是各种菌种系统发育而来，也不是表型相关的一个属。在最近几十年中，分子方法的日益使用为几种新的肠球菌菌种提供了描述说明，并引起了许多命名上的变化，导致目前公认肠球菌属包含57个菌种[截至2018年2月；更多详细信息，请参见参考文献[1]和[5]，以及含命名法的原核生物名称表（http://www.bacterio.net）]。肠球菌属是肠球菌科的模式菌属，粪肠球菌是肠球菌属的模式菌种。

目前，肠球菌属的纳入标准和对新肠球菌种的描述，包括了多种分子生物学技术混合的多重分析（常用的包括DNA-DNA重联实验、16S rRNA测序、脂肪酸甲酯色谱分析和全细胞蛋白质谱分析）和表型检测。16S rRNA测序在辅助鉴定肠球菌菌种方面是非常实用而且强大的方法，也的确被用在了迄今为止所有肠球菌菌种鉴定上，尽管该方法被证实在区分少数肠球菌菌种时有限制[3,5,8]。图24-1显示了基于16S rRNA测序技术的肠球菌属中不同菌种的进化关系，这个数据也被收入了GenBank数据库（截至2018年2月）。针对其他遗传决定簇的测序测定已越来越多地用于评价肠球菌菌种之间系统发育关系及制定肠球菌新种的描述中[1,3,5]。管家基因编码参与基本细胞功能的蛋白质，例如苯丙氨酰-tRNA合酶（*pheS*基因）、RNA聚合酶α亚基（*rpoA*基因）、RNA聚合酶β亚基（*rpoB*基因）和ATP合酶α亚基（*atpA*基因）是这些测序方法的最常见靶标，基于单个基因或多个基因的分析，此类方法是在分析单个或多个基因的基础上，采用多位点序列串联分析的形式进行序列分析[3,9-11]。通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）生成的质谱的比较分析，以及通过全基因组测序（WGS）生成的序列的分析，最近也已被纳入用于分类目的的一系列方法中[12-14]。

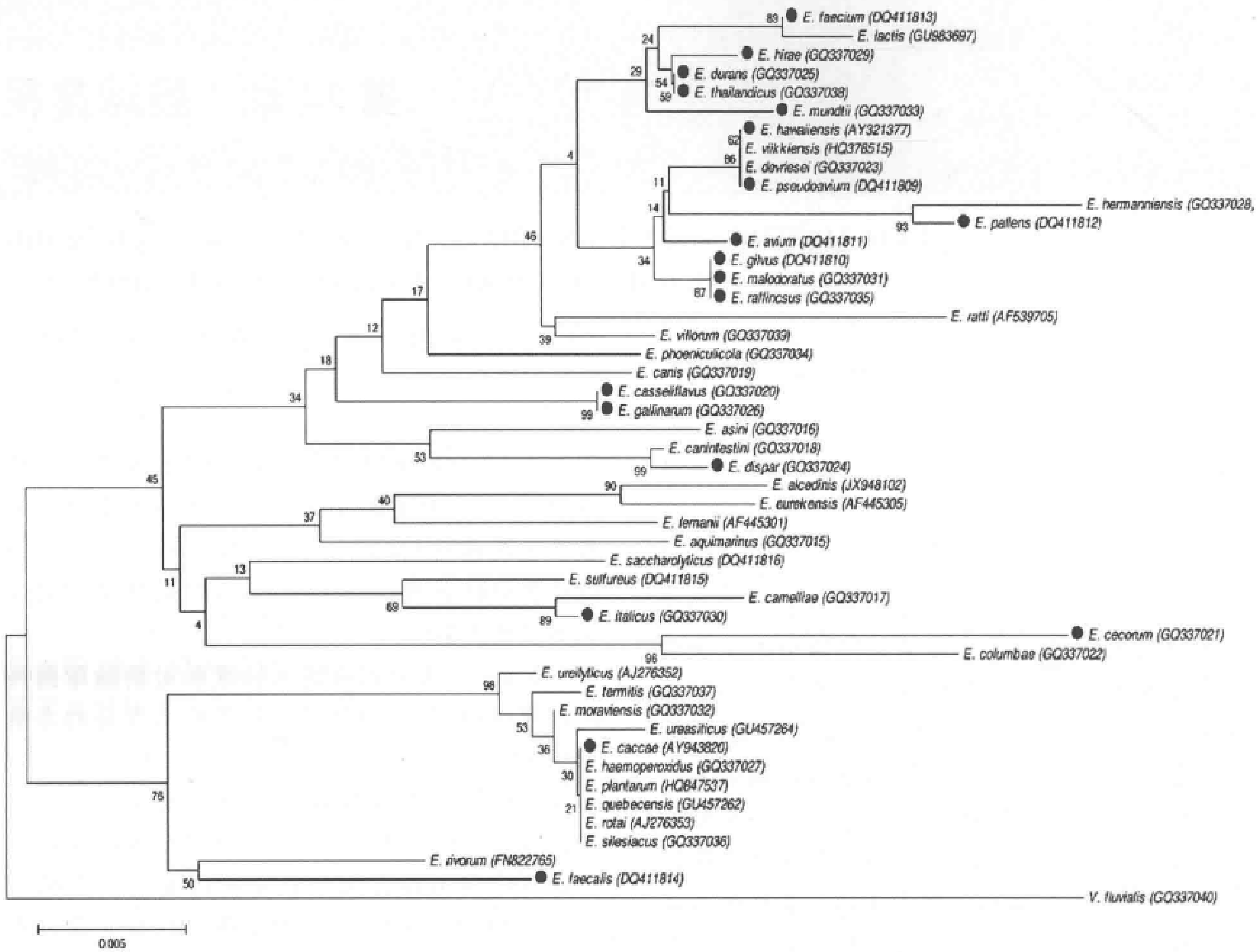


图 24-1 基于 16S rRNA 基因序列分析的进化树，展示肠球菌属中各菌种的进化关系。*Lactococcus garvieae* 作为外菌属比较，在节点引导值以百分比显示。黑点表明已经可以从人源样本中分离的菌种

二、肠球菌属特点

肠球菌属是革兰阳性，触酶阴性球菌，可单个存在，或成对出现，或形成短链，或形成小的不规则簇[5]。它们不形成内生孢子。当肠球菌在固体培养基上培养并革兰染色后，有时会呈现球杆状，在液体培养基(如巯乙酸盐肉汤)中培养后往往呈现卵形并呈链状排列。在血平板上培养 24 h 后，肠球菌菌落直径一般为 1～2 mm，但是部分变种可能更小。大约 1/3 粪肠球菌菌株在兔血、马血或人血平板上呈现 β-溶血性，但在羊血平板上则不呈现溶血性。还有部分粪肠球菌菌株和耐久肠球菌则在所有血平板上呈现 β-溶血性。其他肠球菌菌株通常为 α-溶血或者非溶血。肠球菌是兼性厌氧菌，不产气，具备同型发酵能力，产生 L-(+)-乳酸作为葡萄糖发酵主要终产物。因为肠球菌可以将大量碳水化合物转化为乳酸，故被称为典型的乳酸菌。大多数肠球菌可以在 10～45℃的环境中生存，最适温度为 35～37℃。大部分菌株培育时会使用含 6.5%NaCl 的肉汤培养基，在有胆盐的情况下肠球菌可以水解七叶苷(BE 试验)，肠球菌还可以通过产亮氨酸氨肽酶(LAP 酶)来水解亮氨酸-β-萘胺。除了全部或部分不经常报告的菌种[包括 *Enterococcus bulliens*、狗肠肠球菌(*Enterococcus canintestini*)、盲肠肠球菌(*Enterococcus cecorum*)、鸽肠球菌(*Enterococcus columbae*)、德氏肠球菌(*Enterococcus devriesei*)、摩拉维亚肠球菌(*Enterococcus moraviensis*)、淡黄肠球菌(*Enterococcus pallens*)、解糖肠球菌(*Enterococcus saccharolyticus*)、白蚁肠球菌(*Enterococcus termitis*)及维克肠球菌(*Enterococcus viikkiensis*)]，大

部分肠球菌可以通过产生的吡咯烷酮芳胺酶[又称吡咯烷酮酶(pyrrolidonase,PYRase)]水解 L-吡咯烷酮-β-萘胺(PYR)。LAP 和 PYR 测试的结果并不是固定的,尤其是对于一些刚刚归入肠球菌属的细菌而言,测试结果可能会随着方法的改变而改变,例如,改变测试的方式或改变培养介质等。少数肠球菌(铅黄肠球菌、鸡肠球菌及最近新描述的菌种 *Enterococcus massiliensis*)靠稀疏的鞭毛运动,部分肠球菌(*E. bulliens*,铅黄肠球菌、苍黄肠球菌、蒙氏肠球菌、淡黄肠球菌、植物肠球菌、罗泰肠球菌、硫磺肠球菌和解脲肠球菌)能产生黄色色素[1,3,5]。测试肠球菌动力的方法需慎重,因为目前已经证明培养基内容物的不同对肠球菌的动力有影响[15]。肠球菌不能产生卟啉,因此它无法产生细胞色素酶[5,16]。然而当粪肠球菌菌株在血平板上生长时,有时可以发现有细胞色素活性,并且在触酶试验中有较弱的阳性反应。同时,在血平板上培养血过氧化氢肠球菌、塞利西亚肠球菌、植物肠球菌和 *E. bulliens*[3,12]时都出现了触酶试验阳性的结果。大部分肠球菌都能分泌一种细胞壁相关甘油磷壁酸,属于兰氏血清学分类法的 D 组抗原。编码该抗原的 DNA 中 G+C 含量在 32~45 mol%之间,基因组大小在 2.3~3.4 MB 之间[17-19]。美国首株耐万古霉素的临床菌株——粪肠球菌 V583 的 WGS[20],以及随后的多种肠球菌中其他菌株的 WGS 让人们得以更加深入地研究肠球菌属。目前,多种肠球菌基因组已被完全测序[19]或处于不同的研究阶段,通过专业网站和数据库,如 NCBI(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/? term = enterococcus)、Broad 研究所(https://olive.-broadinstitute.org/projects/enterogenome)、基因组在线数据库(http://www.genomesonline.org)和美国微生物学会(http://genomea.asm.org/)可以获得相关数据。其他触酶阴性的革兰阳性球菌,以及将它们与肠球菌区分的特点将在第 23 章及第 25 章详细讲述。然而,目前还没有任何一个基于表型的标准能够将肠球菌属与其他属完全区分开来,主要原因是肠球菌属并没有一个共同的特有表型。此外,最近新发现的或者鲜为人知的肠球菌种的某些特征还没有被报道。但是对于大部分常见的肠球菌,确实存在特有表型。如果一个革兰阳性球菌,触酶阴性,其菌株在 BE、PYR 和 LAP 试验呈阳性结果,并且可以在 45℃环境,在 6.5%氯化钠培养基中生长,可以初步推测为肠球菌。但是因为有着类似表型的乳球菌属(*Lactococcus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、片球菌属(*Pediococcus*)和漫游球菌属(*Vagococcus* 也可以从人类感染样本中分离出来[21-22],仅仅靠 BE 试验和在 6.5%氯化钠培养基中生长推测肠球菌可能会出现错误。通过血清学实验证明是否有 D 群抗原存在,对于鉴别肠球菌可能有帮助,尽管只有 80%的肠球菌菌株有此抗原。另一方面,牛链球菌-马链球菌复合物(*Streptococcus bovis-S. equinus* complex),以及片球菌(*pediococci*)、明串珠菌(*leuconostocs*)[21]和一些漫游球菌菌株(vagococcal strains)[22]也可以和抗 D 群血清发生反应。考虑到某些特征一直以来是某一种属的典型特征,没有应用于非典型菌株和几个新近鉴定的菌株,上述的标准可能排除了一些菌株或菌种。分子鉴别方法的运用,比如用 PCR 方法检测属特异性的 *tuf* 基因和 MALDI-TOF,可以在一定程度上解决以上的问题,能够正确地在属的水平鉴定典型肠球菌属和不常见的肠球菌菌株[23]。

三、流行病学和传播

肠球菌的一些固有特点能够让它们在恶劣的环境中生存和生长,并定植在多种生态位中。这些微生物在大自然中广泛存在,它们存在于泥土中、植物中、水中、食物中和动物中,包括哺乳动物、鸟类、昆虫和爬行类[2-3,5,24-25]。在人体中,它们主要位于胃肠道,而在其他部位则相对较少,例如泌尿生殖道、口腔、皮肤,特别是会阴部。通常认为肠球菌是人类胃肠道中最丰富的革兰阳性球菌之一,粪肠球菌是从该部位检出的最常见细菌之一[2,24]。同时也发现了不同比例的其他菌种,如屎肠球菌、铅黄肠球菌、耐久肠球菌和鸡肠球菌。人类肠道微生物组中肠球菌的种类和数量的多样性似乎与年龄、饮食和其他能够引起生理环境变化的因素有关,例如,潜在疾病和之前是否接受了抗菌治疗。因为肠球菌属于机会致病菌,在感染者中不同菌种的致病率在一定程度上可以反映出不同菌种肠球菌在人体胃肠道中分布情况。胃肠道可以被认为是与疾病有关菌株的重要储存地;它们可以从胃肠道离开,迁移到别处引起感

染，也能传播给其他宿主或生存在体外环境中[2,26-27]。另一方面，在粪便中肠球菌数量众多，而且它们有着较强的对于不同的物理、化学环境的耐受能力，能够在外环境中存活，这两个特性可以提示我们肠球菌可以被用来检测粪便污染，以及食物、牛奶、饮用水的卫生学质量[2,25,28]。作为人类肠道菌群的一员[2,24]，食物中肠球菌出现和人类安全[28]之间的关系已经被广泛地总结回顾。

耐万古霉素肠球菌(VRE)的传播代表了主要的公共健康问题。肠道携带 VRE 的住院患者似乎是该生物体的主要储存库，一旦 VRE 定植，将在患者体内持续数周或数月。因此，当被肠球菌定植的患者离开医院后，VRE 在社区中传播的可能性不容小觑。VRE 可以通过直接的患者与患者之间的接触进行传播，也可以通过以下方式间接传播：在医护人员的手上，在受污染的医疗仪器(如血糖仪、血压袖带、电子体温计、心电图仪和电线)及在环境表面(如患者的病服和床单、床、床头栏杆、床头柜、地板、卫生间、门把手和洗手盆上)短暂传播[26-27]。这些微生物除了可以在环境表面上长期生存外，还可以耐受热、氯气和某些酒精制剂，从而增加了传播的可能性。

为了应对 VRE 在美国医院中的定植率和感染率上升的情况，疾病预防控制中心的医院感染控制实践咨询委员会制定了指导方针，并提出了预防 VRE 扩散的建议[29]。这些措施包括谨慎使用万古霉素，实施早期检测 VRE 的监视程序及限制交叉污染的感染控制程序，例如，隔离预防措施、洗手和有关 VRE 传播的教育。

尽管只有一小部分定植的患者发展为严重的全身性肠球菌感染，但显然 VRE 的肠道定植与随后的 VRE 感染有关。但是，在某些特定的临床情况下(如肝移植受者、接受慢性血液透析的患者和血液系统恶性肿瘤的患者)，VRE 定植的患者出现严重肠球菌感染的风险增加[26-27,30-33]。这强调了在高危患者群体中进行主动监测以防止传播和暴发的重要性。

四、临床意义

肠球菌是共生微生物，作为机会致病菌，能够在人体中引起多种感染。许多感染被认为是肠球菌从胃肠道中主要定植位置迁移到其他地方引起的。它们通常主要感染尿道、血液、心内膜、烧伤和手术伤口、腹部、胆道、导管和其他置入性医疗设备的位置[27,30-33]。因为肠球菌几乎无处不在，所以在判断某一分离株有无临床意义时要慎重。应当避免一些不必要的工作和可能误导临床的实验室报告，尤其是在是否需要做体外药物敏感试验时(见本节药物敏感试验)。近几十年来，肠球菌从开始被认为几乎是无害细菌，到现在被认为是一类医学上重要的、具有多重抗生素耐药性的与医院相关的病原体，极大增加了患者的发病率、病死率和医疗费用。宿主-细菌共生关系发生动态变化，例如，受广谱抗生素使用、宿主受伤或者宿主免疫力下降的影响，使得这些细菌能够迁移到人体肠外位置而引起感染。因此，那些有着严重基础疾病的年龄较大患者和住院较长时间的严重免疫功能不全的患者，如果还接受过侵入性医疗设备和(或)广谱抗菌治疗，都是肠球菌感染的高危人群[26-27,31-33]。

在肠球菌分离物中已鉴定出几种潜在的毒力因子，这些因子可能在肠球菌感染的发病中起作用，包括表面黏附素 Esp(肠球菌表面蛋白)和聚集素、分泌毒素如细胞溶素/溶血素、分泌蛋白酶如明胶酶和丝氨酸蛋白酶、细胞外超氧化物、MSCRAMM(识别黏附基质分子的微生物表面成分)、Ace(粪肠球菌胶原蛋白的黏附素)、粪肠球菌抗原 A(EfaA)、肠球菌荚膜和细胞壁多糖[27,34]。然而，以上这些尚未被证实是引起人类感染肠球菌的主要毒力因子。肠球菌脱离其共生状态的一种机制是通过获得新的特质，使细菌能克服宿主的防御机制，并定植于新的生态位中，正如粪肠球菌致病岛那样，更多存在于引起感染的菌株中，而非共生菌株中[2,35-36]。在这种情况下，获得性耐药性被认为是毒性肠球菌比普通分离株更常见的许多特征之一，它可使该属的成员在宿主或环境中存活更长的时间，使其长久存在且成为医院相关的主要病原体[2,27,35-36]。另外，肠球菌可以将耐药决定簇转移至其他细菌，如葡萄球菌，这进一步增加了肠球菌的临床重要性。肠球菌能形成生物被膜的能力被列为其最突出的毒性特征之一，这种能力使细菌能够定植于惰性和生物材料表面上，同时保护其不受抗生素杀伤，以及介导其黏附与侵入宿主细胞[32,37]。生物被膜的形成可能对心内膜炎、牙髓感染、尿

道感染、置入物和其他医疗设备相关的感染有重要影响。

与肠球菌有关的各种感染已经被全面地综述与总结过[30-31,33]。尽管继 Murray 的综述[30]以后肠球菌引起的感染谱几乎没有发生变化，研究者还是发现肠球菌作为与医院获得性感染相关的病原菌，近年流行趋势不断增强。在美国，肠球菌已经成为第 2 或第 3 位导致院内尿路感染（UTIs）、伤口感染（多为手术伤口、压疮、烧伤）和菌血症的病原菌[30-31, 33, 38-40]。UTIs 为最常见的肠球菌感染：所有的 UTIs 中约 10％与肠球菌有关，而高达约 16％的医院相关 UTIs 与肠球菌有关。肠球菌菌血症常与多器官转移性脓肿有关，而且造成高病死率。肠球菌也被认为是感染性心内膜炎的重要病原菌之一，据估计，约 20％的自身瓣膜细菌性心内膜炎与 6％～7％的人工瓣膜细菌性心内膜炎由肠球菌引起。心内膜炎始终是最难治疗的肠球菌感染类型之一，因为针对肠球菌的抗生素治疗十分有限，尤其是耐万古霉素肠球菌感染（VRE）。腹内和盆腔感染也常与肠球菌有关。然而，从腹膜炎、腹腔或盆腔脓肿、胆道感染、手术部位感染和子宫肌内膜炎等患者样本往往培养出多种细菌，而肠球菌在其中的作用还是存在争议。在做出临床诊断前需要仔细分析从这些样本中分离的细菌的意义。还有一个问题正受到越来越多的关注：肠球菌在牙髓感染、置入性医疗器械相关感染中起到什么作用[32,37]。肠球菌可能会引起呼吸道感染、中枢神经系统感染，以及中耳炎、鼻窦炎、脓毒性关节炎和眼内炎，但临床比较罕见。

不同肠球菌菌种的分离比例会根据分离环境的不同而改变，也会被一系列因素影响，包括暴发性菌株的传播增加，如耐万古霉素屎肠球菌。粪肠球菌和屎肠球菌是从人标本中分离出的最常见的肠球菌。据以前报道，粪肠球菌占有临床意义的肠球菌株的 80％～90％，而屎肠球菌占 5％～10％[30, 41-42]。然而值得注意的是，粪肠球菌与屎肠球菌的比值正呈下降趋势，尤其是在血流感染的分离株中[2, 39-40, 43-44]。大约还有其他 19 种肠球菌从人体中分离出来，但其发生频率要低得多，即使已报道过与铅黄肠球菌、鹑鸡肠球菌和棉子糖肠球菌相关的感染群[45-48]。其他肠球菌菌种如鸟肠球菌（*E. avium*）、粪便肠球菌（*E. caccae*）、狗肠肠球菌（*E. canintestini*）、盲肠肠球菌（*E. cecorum*）、殊异肠球菌（*E. dispar*）、耐久肠球菌（*E. durans*）、苍黄肠球菌（*E. gilvus*）、“*E. hawaiiensis*，”小肠肠球菌（*E. hirae*）、意大利肠球菌（*E. italicus*）、病臭肠球菌（*E. malodoratus*）、蒙氏肠球菌（*E. mundtii*）、淡黄肠球菌（*E. pallens*）、假鸟肠球菌（*E. pseudoavium*）、泰国肠球菌（*E. thailandicus*）及 *E. massiliensis* 都曾零星地从人样本中分离到过。

尽管肠球菌可以引起社区和医院内的感染，在 20 世纪 70 年代末，这些微生物才开始逐渐被认为是导致医院获得性感染的常见病因，而且还对当时常用的抗生素越来越具有耐受性。在美国第一次报道医院内出现并快速传播 VRE 后，肠球菌感染发生率和流行病学受到明显的重视。从 1989 年到 1999 年，美国医院报道分离的 VRE 比例从 0.3％上升超过 25％[38]。从那以后，肠球菌已经成为从美国重症监护病房患者中分离出来的第 2 或第 3 位（取决于感染类型）常见的医院相关感染的病原菌[49]。在 2011－2014 年美国疾病预防控制中心（CDC）的国家医疗安全网（NHSN）的报道中，肠球菌被列为第 2 大引起医院相关感染的耐药菌，约 14.7％的感染是由其引起的[40]。这篇报道称，在血流感染样本中分离的约 9.8％的粪肠球菌和 83.1％的屎肠球菌对万古霉素耐药[40]。如今耐万古霉素肠球菌已在全球范围内出现与传播。根据欧洲疾病预防和控制中心 2013－2016 年的监测报告，在几个欧洲国家中，侵入性 VRE 屎肠球菌的患病率为 0.0％～46.3％，而粪肠球菌对万古霉素的耐药性仍然较低[44]。耐万古霉素肠球菌在其他地区也有报道，包括南美、亚洲和澳大利亚，说明了引起医院相关感染的耐万古霉素肠球菌存在大规模流行性传播[26-27, 33, 50-51]。

五、收集、运送和样本的储存

收集可能带有肠球菌的血样本、尿样本、伤口分泌物，以及其他分泌物和拭子标本的标准方法已详细阐述（第 19 章）。一般无须专门运送和储存含有肠球菌临床样本的方法或流程，这是因为这些细菌容易恢复活性而且对环境变化，以及不利条件具有抗性。几乎所有处于干燥状态的培养基和拭子都能用于运送。和其他的临床样本一

样，肠球菌样本同样需要尽快进行培养。研究显示，在4℃或室温下，耐万古霉素肠球菌能在Amies培养基上存活14天[52]。此外，在运送通过直接PCR实验[53]（下文"直接检查"中提到）检测VRE的直肠标本时，Amies培养基比Stuart培养基更可靠。

冻干状态的肠球菌可以长期保存。经验告诉我们，培养基在－70℃或更低的温度下能够保存很多年，因为是把高浓度细菌悬液直接接种于去纤维蛋白的羊血或兔血中，或者接种于含甘油(10%)的脱脂奶(10%)溶液中保存。上述方法均是推荐的用来保存肠球菌的方法。它们也能在常用于保存细菌的其他冷冻保存介质中，于－20℃保存许多年。大多数的肠球菌能于4℃下，在以普通琼脂基质[如脑心浸出液琼脂(BHI)和胰蛋白酶大豆琼脂]制备的琼脂斜面上存活数月。但是某些不太常见的肠球菌种对不利条件的抗性不强，在没有充分保存措施下它们不会存活很久。

六、直接检查

(一)显微镜检查

直接镜检观察革兰染色的无菌标本，如血液样本，对于诊断肠球菌感染很有用。直接镜检非无菌标本也能提供信息，但是这些信息不应该被夸大。无论如何，都只能做出"成对/成串存在革兰阳性球菌"的推测性报告，因为镜检不能鉴别肠球菌和其他革兰阳性菌。所以需要进行培养和用合适的鉴定技术来确认。

(二)核酸检测

因为VRE的出现已经成为一个重要的全球公共卫生问题，医院要采取一定的监测措施用于VRE的检测[26-27,29,31,33,53]。为了克服以培养为基础的检测技术的局限性（在本节"分离步骤"中将讨论到），以PCR为基础的直接检测临床样本和监测样本中微生物的技术已经通过临床评估[54-66]。几乎所有评估研究都表明，与传统培养技术相比，直肠拭子和粪便标本中VRE的检测有所改善，有助于缩短检测时间并潜在地降低VRE传播的风险。主要有3种商业化检测系统，它们分别是LightCycler *vanA*/*vanB* 试剂盒（Roche分子诊断）、GenOhm VanR试剂盒（Becton-Dickson微生物系统）和Cepheid Xpert *vanA*/*vanB* 试剂盒[56-66]。Roche LightCycler *vanA*/*vanB* 检测试剂盒可在欧洲使用，但在美国还没有被准许应用于诊断当中。值得注意的是，这些系统使用专有序列检测 *van* 基因，并且敏感性可能有所不同。特异性也是一个潜在的问题，除非包括用于属和(或)种鉴定的PCR对照，因为可能在肠球菌以外的其他肠道菌群中也发现 *van* 基因，尤其是 *vanB*[58,60,62-63,65-66]。*vanA* 或 *vanB* 在特定种群中的分布将影响用于检测 *van* 基因的PCR检测的特异性[62]。丹麦的研究人员证明了这种情况，他们能够使用Xpert *vanA*/*vanB* 系统准确地追踪 *vanA* 肠球菌的传播[64]。这些研究人员得出结论，尽管PCR测试的实验室成本增加，但可以减少患者隔离时间从而使分子测试具有成本效益。使用选择性富集肉汤（在下面的"分离程序"中讨论）可以解决用于VRE鉴定的PCR系统中 *vanB* 部分的特异性问题[61,63]。结果表明，在富集肉汤培养物中使用这些检测方法能更精确地检测 *vanB* VRE，这被认为是一种有用且快速的工具。但是，当使用选择性富集肉汤代替直接直肠或粪便样品时，这些测试便不再是直接检测了。

目前已对直接在血液样本中快速检测和鉴定肠球菌的方法进行了评估。一种实验室开发的实时PCR检测方法已被提出，此方法无须先培养即可定量检测血样中的粪肠球菌DNA，可用于诊断菌血症[67]。LightCycler SeptiFast Test是一种多重实时PCR测定法，专为LightCycler 2.0仪器设计，用于快速检测和鉴定医源性血流感染的主要病原体，包括直接来自全血的粪肠球菌和屎肠球菌[68-69]。另一种多重实时PCR检测方法是Magicplex Sepsis real-time test，旨在鉴定导致血流感染的多种成分，包括粪肠球菌、屎肠球菌和鸡肠球菌，以及耐药基因 *vanA* 和 *vanB*[70]。2种测试均可在欧洲和世界其他地区使用，但尚未获得FDA批准。最近，T2细菌检测法是一种有前途的工具，可以直接在全血样本中可靠地鉴定屎肠球菌[71]。该测定法使用T2磁共振技术，在全自动T2Dx仪器平台上运行，可以检测多种ESKAPEc（屎肠球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌）病原体，其中包括屎肠球菌。此

诊断测试已获得 CE 认证,目前正在 FDA 进行审查。随着相关技术的发展和进步,这些分子方法可能会得到更广泛的应用,以快速而准确地直接从临床样本中检测肠球菌。但是,这些方法能否真正有效地用于侵袭性肠球菌感染的实验室诊断,以及临床治疗,仍然还需要进一步的评估来确定。直接在阳性血培养瓶中使用分子方法进行快速检测的方法将在下面进行讨论(请参见下文“鉴定”中的分子方法)。

七、分离步骤

用于检测肠球菌的临床样本来源决定了初始分离的培养基类型。如果临床样本来源于普通无菌部位,可以直接接种于非选择性培养基上,例如,胰蛋白酶大豆琼脂,脑心浸出液琼脂,或者含有 5%羊、马或兔血的血琼脂上。总的来说,与临床最相关的菌种能够在 35～37℃的环境中生长良好,而且不需要高浓度的 CO_2,尽管有些菌种在高 CO_2 环境中生长更佳。血培养标本需要传统血液培养系统进行培养。如果临床样本来源于非无菌部位,尤其是被大量革兰阴性细菌污染的地方,较好的方法是用选择培养基进行初始分离。在这种情况下,肠球菌的含量不高,还需要考虑是否选用富集液体培养基。初始分离采用富集液体培养基会使菌种鉴定时间延迟,但能够提高肠球菌的检出率。如前所述,已设计出许多不同的培养基来选择性分离肠球菌[72]。

在肠球菌中日趋增加的万古霉素耐药性已经引起了大家对选择性分离 VRE 重要性的关注。早期明确 VRE 感染与定植被推荐为有效防止这些病原体的播散的有效方法[26-27, 29, 31, 33, 53]。现在医院感染控制所推荐的方法可能包括对粪便中 VRE 进行筛查培养。从含有正常菌群的样本如粪便样本和直肠或肛周拭子中分离 VRE,不同实验室使用含有不同成分的选择性平板或者肉汤培养基及不同的检测程序进行分离培养。绝大多数都是选择性平板成分不同,包括抗生素成分或者抗生素浓度不同等。尽管大家对于分离 VRE 的标准程序还没有达成共识,但使用选择性富集液体培养基对增加 VRE 的检出率可能是一种高效方法。因此,各医院已经开始使用添加浓度为 3～30 μg/ml 万古霉素的 BHI 培养基[55, 62, 70, 72]。BEA 培养基添加浓度为 4～15 μg/ml[54, 56, 66, 72-74]的万古霉素,以及肠球菌肉汤培养基添加浓度为 4～64 μg/ml[54, 62, 72-74]的万古霉素也已被用于一系列的研究中。基于 BE 的肉汤培养基比基于 BHI 的培养基具有的一个优势是,当肠球菌生长时,包含七叶苷的培养基会变成黑色,因此,如果含有七叶苷的培养基没有变黑,则可以推测不存在肠球菌。有几项研究都发现,使用选择性富集肉汤得到的 VRE 检出率比直接接种更高[72-73, 75-77]。在不同浓度的万古霉素中,最常使用的浓度是 6 μg/ml。在一些实验方法中,也有在富集肉汤中加入不同浓度的其他抗生素,如氨曲南、美罗培南和克林霉素。目前,还没有进一步比较不同选择性富集肉汤对 VRE 检出率的研究报告。

包含显色底物的培养基也被推荐用于分离和鉴定肠球菌[58,75-86]。表 24-1 包含了一系列商业化的显色培养基,包括了每种培养基所用的万古霉素浓度。这些培养基中的大多数都可以鉴定出 2 种主要的耐万古霉素肠球菌:粪肠球菌和屎肠球菌。经 FDA 批准用于人类标本的显色琼脂为 Brilliance VRE 琼脂、ChromID VRE、CHROMagar VRE、Spectra VRE 和 VRE Select(表 24-1)。Colorex VRE 琼脂未经 FDA 批准,但可作为研究产品使用。对 VRE 具有选择性的某些显色培养基比基于 BE 的选择性培养基具有优势,因为菌落的颜色可以帮助推测鉴定 VRE 菌种。在一些监测研究中,在接种显色琼脂之前进行选择性富集,而在其他情况下,将临床样品直接接种在琼脂表面。据报道,在某些情况下,某些显色琼脂可能会产生“假阳性”结果。一项使用 Spectra VRE 在新生儿重症监护病房中监测 VRE 的调查显示,这种培养基上生长了一些对万古霉素敏感的肠球菌[85]。在某些情况下,可能有必要从环境表面回收 VRE 以进行流行病学研究。使用预先湿润的拭子擦拭这些表面,之后接种到选择性富集液体培养基或者选择性琼脂平板,可以从这些表面分离到细菌。

表 24-1 商业化的用于选择性分离耐万古霉素肠球菌的琼脂培养基

培养基	提供商	万古霉素浓度(μg/ml)	微生物:菌落颜色	参考文献
BE-azide agar; BE-azide agar with vancomycin	Many	6 或 8	肠球菌属:黑色	54-56, 61, 66, 73, 79, 82
Brilliance VRE agar	Oxoid	未报道	粪肠球菌:蓝到浅蓝色 屎肠球菌:深蓝色(靛蓝)、粉紫色	74,83,86
Campylobacter agar	Many	10	肠球菌属:与常规血平板上菌落相似	76,82
ChromID VRE	BioMérieux	8	粪肠球菌:蓝到绿色 屎肠球菌:紫色	58,74,75,77,80,81,83,86
CHROMagar VRE	CHROMagar	6	粪肠球菌和屎肠球菌:粉到淡紫色	64,74,81,83
Colorex VRE agar	BioMed Diagnostics	6	VanA 或 B 肠球菌属:淡紫色 Van C,D,或 E 肠球菌:蓝色	84
Enterococcosel agar	Many	6 或 8	肠球菌属:黑色	59,61,80
Oxoid VRE	Oxoid	6	粪肠球菌:浅蓝色 屎肠球菌:靛蓝	84
Spectra VRE agar	Remel	6	粪肠球菌:蓝到浅蓝色 屎肠球菌:粉到浅紫或深蓝色	55,77,82,85
VRESelect	Bio-Rad	8	粪肠球菌:蓝色 屎肠球菌:粉色	74,77

基于培养法筛查 VRE 的方法可能十分费力,需要几天才能完成,而且敏感性差异较大,所有这些都会影响感染控制措施的及时实施。因此,一些微生物实验室已经开始考虑引进分子生物学技术来检测 VRE,这样不仅能快速并准确地鉴定细菌,而且比培养方法有更高的敏感性。然而,现在许多检测方法依然需要先进行细菌培养,再进行检测,整个过程需要 24 h 或者更久。于是,大家还是非常关注更加快速的直接从临床样本中检测 VRE 方法的应用(见上述的"直接检查"部分)。

此外,由于一旦实验室报告出 VRE 阳性的病例,将会启动一系列耗时耗费的感染控制措施,因此实验室必须确保任何可疑 VRE 分离株的流行病学意义。在感染控制中,最主要的关注点是可播散的、高水平耐万古霉素的分离株,尤其是那些由 *vanA* 或 *vanB* 基因编码耐药性的细菌,最常见的就是粪肠球菌和屎肠球菌(见下面"抗菌药物敏感性试验"部分)。相反,含有 *vanC* 基因的低水平耐药细菌,以及广泛播散的耐药菌种没有关联,在感染控制监测中不是很重要不仅从临床和筛查样本中分离出 VRE 十分重要,建立快速确定耐药可能机制的操作程序也同样重要(见下面"抗菌药物敏感性试验"部分)。

八、鉴定

(一)用常规生化试验进行鉴定

一旦确定一种未知的触酶阴性的革兰阳性球菌是肠球菌或与其密切相关的菌属(关于"属的描述"见前文),表 24-2 中列出的相应试验可用于鉴定其菌种。表 24-2 中关于其表型特征的数据均来自 CDC 链球菌实验室所做的常规生化检测(β-半乳糖苷酶除外)(见 https://www.cdc.gov/streplab/strep-doc/index.html)以鉴定最常从人样本中分离到的肠球菌。非人类来源的菌株,即使是众所周知的菌种,这些试验的结果也可能与人类来源的菌株不同。表 24-2 中也包括了一些至今尚未从人体中检出的菌种,因为将来它们有可能会从人的样本中分离到。最近提出的两大菌种 *Enterococcus pernyi* 和 *Enterococcus wangshanyuanii* 并未包含在表 24-2 中。根据甘露醇和山梨糖是否产酸以及精氨酸水解试验,可初步将肠球菌分为 5 群。值得注意的是,这种对菌种表型的分类有利于诊断,但似乎不能反映肠球菌属之间的系统发育关系,因此,不一定与 16S rRNA 基因序列关系相关。通过常规测试鉴定肠球菌种类可能很耗时,并且可能需要孵育测

表 24-2 用于鉴定肠球菌菌种及一些生化试验相似的其他革兰阳性球菌的表型特征

菌群和菌种[a]	表型特征[b]														
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MGP	TRE	XYL	GAL
Ⅰ群															
鸟肠球菌	+	+	−	+	+	−	−	−	−	+	+	V	+	−	V
棉子糖肠球菌	+	+	−	+	+	+	−	−	−	+	+	V	+	−	−
香坊肠球菌[c]	+	+[d]	−	+[d]	+	−	−	−	−	+[d]	+	+[d]	+	+[d]	−
E. crotali[c]	+	+	−	−	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−
苍黄肠球菌	+	+	−	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+	−	−
淡黄肠球菌	+	+	−	−	+	+	−	−	+	+	−	+	+	−	−
解糖肠球菌[c]	+	+	−	−	+	+	−	−	−	+	−	+	+	−	+
病臭肠球菌	+	+	−	−	+	+	−	−	−	+	+	V	+	V	+
E. olivae[c]	+	+	−	−	+[d]	+	−	−	−	+	+	+[d]	+	−	−
解脲肠球菌[c]	+	+	−	−	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−	−
假鸟肠球菌	+	+	−	−	+	−	−	−	−	+	+	+	+	V	V
德氏肠球菌[c]	+	+	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	+	−	−
"*E. hawaiiensis*"[c]	+	+	−	−	+	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−
Ⅱ群															
屎肠球菌	+[e]	−	+	+	V	V	−	−	−	+[e]	−	−	+	−[e]	V
铅黄肠球菌	+	−	+[e]	+	V	+	−[e]	+[e]	+[e]	+	V	+	+	+	+
鸡肠球菌	+	−	+[e]	+	−	+	−	+[e]	−	+	−	+	+	+	+
蒙氏肠球菌	+	−	+	+	V	+	−	−	+	+	−	−	+	+	V
乳酸肠球菌[c]	+	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−	+
新疆肠球菌[c]	+	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−	+
粪肠球菌	+[e]	−	+[e]	−	+	−	+	−	−	+[e]	+	−	+	−[e]	−
血过氧化氢肠球菌[c]	+[f]	−	+[f]	−	−	−	−	−	−	+	−	+	+	−	−
罗泰肠球菌[c]	+	−	+	−	−	−	−	−	+	+	−	+	+	−	−
泰国肠球菌[c]	+	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−	−
乳球菌属	+	−	+	−	−	−	−	−	−	V	−	−	+	−	−
Ⅲ群															
殊异肠球菌	−	−	+	−	−	+	−	−	−	+	+	+	+[d]	−	+
犬肠肠球菌[b]	−	−	+	−	−	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−
E. saigonensis[c]	−	−	+	−	−	+	−	−	−	+	+	−	+	−	−
小肠肠球菌	−	−	+	−	−	+	−	−	−	+	−	−	+	−	V
E. massiliensis[c]	−	−	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+
耐久肠球菌	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−[e]	−	V
鼠肠球菌	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	V	−	−
维洛肠球菌	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+
Ⅳ群															
海水肠球菌[c]	−	−	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	+	+	+
啄木鸟肠球菌[c]	−	−	−	+	−	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+
迪埃丝肠球菌[c]	−	−	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+
魁北克肠球菌[c]	−	−	−	+[d]	−	−	−	−	−	+	−	V	+	−	+
盲肠肠球菌[c]	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	+	−	+	−	+
硫磺肠球菌[c]	−	−	−	−	−	+	−	−	+	+	+	+	+	−	+
E. bulliens[c]	−	−	−	−	−	+	−	−	+	+	−	+	+	−	+
驴肠球菌[c]	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	+	+	+
粪便肠球菌	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	+	−	−
塞利西亚肠球菌[c]	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+[f]	+	+	+
白蚁肠球菌[c]	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	−
Ⅴ群															
犬肠球菌[c]	+	−	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+
鸽肠球菌[c]	+	−	−	+	+	+	−	−	−	+	+	+[d]	+	+	−

（续 表）

菌群和菌种[a]	表型特征[b]														
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MGP	TRE	XYL	GAL
乐玛尼肠球菌[c]	+	−	−	+	−	+	−	−	−	+	+	+	+	+	+
摩拉维亚肠球菌[c]	+	−	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+[d]	+
尿肠球菌[c]	+	−	−	+	−	−	−	−	−	+	−	+	+	−	−
茶肠球菌[c]	+	−	−	+[d]	−	+[d]	−	−	−	+	+	+	+	+[d]	−
赫曼尼肠球菌[c]	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
意大利肠球菌	V	−	−	−	V	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−
阿尔肠球菌[c]	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	+[d]	+	+
埃肯肠球菌[c]	+	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+	+	+	+
植物肠球菌[c]	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	+[d]	+	−	−
瑞氏肠球菌[c]	+	−	−	−	+	−	−	−	−	+	−	+	+	+	−
维克肠球菌[c]	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+[d]	−	+	−	−
河流漫游球菌	+	−	−	−	+	−	−	+	−	+	−	+	+	−	−

注：[a] 名称用粗体表示已从人类分离得到的菌株。[b] 缩写和符号：MAN. 甘露醇；SOR. 山梨糖；ARG. 精氨酸；ARA. 阿拉伯糖；SBL. 山梨醇；RAF. 棉子糖；TEL. 0.04% 亚碲酸盐；MOT. 动力；PIG. 色素；SUC. 蔗糖；PYU. 丙酮酸盐；MGP. 甲基-α-D-吡喃葡糖苷；TRE. 海藻糖；XYL. 木糖；GAL. 2-萘基-β-D-半乳糖苷；+. 90% 及以上菌株阳性；−. 90%及以上菌株阴性；V. 可变（11%～89%的菌株阳性）。[c] 依据典型菌株的表型特征。[d] 弱反应。[e] 偶尔会有例外出现（<3%的菌株显示非典型性反应）。[f] 阳性出现晚（需培养 3 天或 3 天以上）

试长达 10 天才能进行最终鉴定。另一方面，人来源的大多数分离株可在孵育 2 天后鉴定。

（二）采用商业化仪器系统进行鉴定

临床诊断实验室可使用一些商业化小型的、手动化、半自动化、全自动化系统替代传统的常规试验进行肠球菌菌种的表型鉴定。自这些系统使用以来，研究人员越来越注重其不精确度，从而促使这些系统不断升级以改进其性能特征及增强其鉴定能力[23,47,87]。通常情况下，这些系统对常见菌种如粪肠球菌，以及相对较少的屎肠球菌的鉴定是比较可靠的。尽管系统的模式和数据库已更新升级获得改善，大多数系统对其他菌种的精确鉴定仍依赖于其他一些试验。已知现在用于肠球菌菌种鉴定的商业化系统包括 API 20S 和 API Rapid ID32 STREP 系统，Crystal Gram-Positive 和 Crystal Rapid Gram-Positive 鉴定系统，以及自动化系统上的识别面板，包括 Vitek 的商业鉴定板条（bioMérieux）、MicroScan 和 BD Phoenix 系统（Becton Dickinson Microbiology Systems）。总体而言，大部分从人类标本分离而来的肠球菌菌种均能被多数现有的商业鉴定系统准确地鉴定出来。然而，其准确度依赖于每个特定环境中的菌种分布。例如，在最近的评估中，发现 Vitek 2 系统在属和种水平上分别鉴定出一组肠球菌分离株的准确性是 99.2%和 91.7%，但铅黄肠球菌和鸡肠球菌在菌种水平被正确鉴定的比例是 76%[88]。这些数字与我们使用 Vitek2 所做的观察大体上一致，这表明 Vitek2 在区分铅黄肠球菌和鸡肠球菌、鸟肠球菌和棉子糖肠球菌、假鸟肠球菌和耐久肠球菌、小肠肠球菌和屎肠球菌时效率较低（数据未发表）。已经报道了对不同肠球菌菌种鉴定难度，有时包括粪肠球菌和屎肠球菌[23,89-90]。严格遵守厂商提供的说明书，包括使用何种检测所需菌株生长的培养基，是非常重要的。笔者自己尚未发表的实验结果表明，不同的生长条件可导致一些试验结果的变化，从而干扰鉴定的准确度。此外，应始终考虑制造商说明书中通常规定的每个系统的分辨率限制。用商业化系统鉴定不常见的肠球菌菌种时，在报告结果前应用参考方法进行确认。

（三）采用 MALDI-TOF MS 进行鉴定

在过去的几年中，在临床微生物实验室中利用 MALDI-TOF MS 进行细菌鉴定被认为是一项革命性的技术，它可以快速、准确、高度方便地鉴定包括肠球菌在内的多种微生物[89,91]。目前主要有两大 MALDI-TOF MS 平台，Microflex LT Biotyper 和 Vitek MS 系统。对这些平台的评估结果表明，它们能够正确识别出所测试的大多数肠球菌分离株[88-89,92-93]。然而，到目前为止，仍无法对其中任何一个系统进行全面评估（包括测试所有不同的肠球菌菌种），粪肠球菌、屎肠球菌、铅黄

肠球菌和鸡肠球菌是通过此方法进行广泛测试的菌种。尽管研究的数量和参与检测的菌种仍有限，但结果表明，该方法对于快速鉴定人类标本来源的主要肠球菌种类是一个重要的工具，并且非常值得对其鉴定肠球菌属不同成员的能力进行深入评估，包括鉴定具有不同生化指标和不同来源菌株的能力。此外，MALDI-TOF MS 技术也已直接应用于血培养和尿培养阳性标本的鉴定而不需要额外的细菌培养[94-95]，但在用作诊断肠球菌感染的常规方法之前，这些方法学仍需要改进。

(四)采用分子生物学技术进行鉴定

分子生物学方法，如 DNA-DNA 杂交和 16S rRNA 基因测序，在参考实验室或研究型实验室中主要被用于细菌分类。然而，在过去的几十年中，分子生物学技术在快速鉴定肠球菌菌种方面的应用得到了显著扩展，已用于临床微生物实验室中。

鉴定肠球菌种类的各种分子生物学操作程序已在过去的综述和总结中提出[1,71]。大部分分子生物学操作程序只在少数实验室应用，并且尚未评估其鉴定所有肠球菌种的能力。大部分操作程序可能适用于所有肠球菌的鉴定，其他一些程序可能仅适用于种特异性分析。其中部分程序值得进一步扩大检测和改进，因为它们是更快速准确鉴定肠球菌种类的很有前途的辅助工具。

在表 24-2 中，描述了本章节中讨论的肠球菌属表型特征，是基于表型试验与全细胞蛋白(WCP)分析的相关性，并结合 DNA-DNA 杂交试验和 16S rRNA 基因测序得到的[1-2,96-97]。16S rRNA 基因测序是现今鉴定肠球菌菌种中使用最多的核酸方法。它可以用于检测所有的肠球菌，这些序列可以与公共数据库的核苷酸序列比对，比如 GenBank 数据库。可以使用其中一个序列比对软件包进行序列比对，其大多都可供公众查阅。图 24-1 描述了肠球菌属中各菌种 16S rRNA 基因序列比对产生的谱系图。然而，由于其中一些 16S rRNA 基因的约 1500 个碱基跨度中只有 2～3 个碱基有差异，所以不是所有肠球菌的种类都能明确区分。因此，这个方法不应单独使用，而应该联合表型特征和其他一些分子生物学技术共同分析，这对建立肠球菌菌种信息库是一项重要的技术手段。研究发现，其他几个管家基因也可作为替代工具，以开发基于测序的方法来鉴定肠球菌，可以单独或联合使用。这些基因包括 *atpA*、*pheS*、*rpoA*、*rpoB* 和 *sodA*(编码锰超氧化物歧化酶)和 *tufA*(编码延长因子 Tu)[2-3,9-11,98]。它们的使用主要限于分类学目的，迄今尚未将其系统地应用于所有肠球菌菌种。

基于 PCR 的技术在快速、准确鉴定肠球菌方面已经成为关注的焦点。编码 D-丙氨酸-D-丙氨酸连接酶(*ddl*)[23,89,99]的基因或 *sodA* 基因[23]扩增实验已被设计可以鉴定一些肠球菌种类，并成为快速常规鉴定方便可行的替代方法。然而，基于这些靶标的 PCR 方法还不能应用于全部肠球菌种的鉴定。

现已研究了使用分子方法直接从阳性血培养瓶中快速鉴定肠球菌的方法，并且已开发并评估了用荧光原位杂交(FISH)技术直接鉴定阳性血培养瓶中肠球菌的方法[100-101]。其中一种检测方法——粪肠球菌/其他肠球菌菌种(EF/OE)PNA FISH，是 FDA 批准的肽核酸(PNA)荧光原位杂交(FISH)试验。近期的多中心研究显示，EF/OE PNA FISH 方法能在 1.5 h 内得出可靠结果，与原来检测程序所需的 2.5 h 相比，进一步减少了报告周转时间(TAT)[101]。其他获 FDA 批准基于核酸技术的商业化诊断系统包括：Verigene 革兰阳性血培养(BC-GP)核酸检测试剂盒[102-103]和 FilmArray 血培养鉴定组合[104]。这些多重检测方法能检测出包括肠球菌在内的引起血流感染最主要的革兰阳性病原菌，以及万古霉素耐药的基因标志物 *vanA* 和 *vanB*。这些方法相对容易实施，比常规微生物鉴定法能更早鉴定肠球菌导致的侵袭性感染。据近期的报道，通过减少抗菌治疗时间、住院时间和医疗费用，这些技术对患有肠球菌菌血症患者的临床转归和经济支出有显著影响[105]。

九、分型系统

肠球菌作为医院感染重要病原菌的临床分离率不断增多，且经常对抗生素多重耐药，同时，也发现有肠球菌的外源获得性感染，这些因素使得对肠球菌菌株进行分型和流行病学研究显得尤为重要。用于研究已知肠球菌菌株之间多样性的经典表型方法，往往不能充分将菌株区分开来，并且在流行病学研究中的价值有限。然而，结合分子生物学数据的表型信息可以形成有价值的信息[1,71]。

分子生物学技术的引入大大提高了对肠球菌种的鉴别能力,并且为肠球菌的流行病学研究开拓了重要途径。利用分子生物学分型方法,可以证明患者是否可以通过直接或间接接触而感染外源性肠球菌,打破了肠球菌感染是内源感染的传统观念。耐药肠球菌,尤其是VRE被广泛报道可以院内感染和院外传播[1,27,31,33,50-51,106]。除了流行病学调查,一些分子生物学分型技术被用于追踪肠球菌在不同环境和宿主间的传播和研究多重耐药菌的演变,极大地扩展了人们对肠球菌流行病学、种群结构、抗生素耐药性和毒力的了解。已经发现某些流行性肠球菌克隆株的出现和全球性播散[2,35-36,43,50-51,107]。

在之前的综述中,已提出用几种分子生物学技术对肠球菌菌株进行分型[1,3,5,71],除了复杂度和成本上的差异,这些方法在重复性和鉴别能力上也有所不同。总的来说,肠球菌没有单一、明确的分型技术,因此,不同分型技术(尤其是基于不同基因多态性的技术)结果间的强匹配性,可作为高度相关性的指示。这些技术中,用脉冲场凝胶电泳(PFGE)进行染色体DNA限制性片段多态性分析已被广泛用于肠球菌暴发的流行病学特征调查,该方法提高了分辨力并能鉴定出主要的多重耐药肠球菌克隆株,主要是氨基糖苷类高度耐药(HLR)和VRE分离株[1-3,42,106]。SmaI是一种限制性内切酶,常用于消化肠球菌DNA,也有报道可以使用诸如ApaI和SfiI等其他内切酶[1]。

众多研究人员认为PFGE是肠球菌暴发流行病学分析的金标准,但由于缺乏用于执行、解释和结果命名的标准程序,实验室间数据交换和比较仍然十分困难。另一方面,尽管PFGE分辨率较高,但PFGE图像的流行病学解释并不总是很清晰。遗传事件的发生可能与PFGE条带的实质性变化相关,导致克隆分析出现问题[107]。由于可能存在这些肠球菌DNA带型不一致现象,因此,建议PFGE方法主要用于基因相关性分析,以及追踪克隆株的传播与时间和地域上的相关性,而其在长期流行病学研究中的作用有限。高度推荐用PFGE技术结合至少一项其他分型技术,或者单独使用PFGE图像分析但使用不同的限制性内切酶进行实验,这样有利于更清楚的流行病学解释。根据条带差异对分子分型数据进行解释的一般规则通常也适用于对肠球菌菌株PFGE图像的解释[1,108]。未知菌株需与已知特征的质控菌株一起分析。2株参考菌株:粪肠球菌OG1RF(ATCC 47077)和屎肠球菌GE1(ATCC 51558)可用作质控菌株[108]。

另外2种强大的分子生物学技术是多位点序列分型(MLST)和多位点可变数目串联重复序列分析(MLVA)。这些技术通过生成适用于开发网络数据库的信息,克服了不同实验室间数据比对的困难。MLST是基于一些特定管家基因内部片段测序后的等位基因鉴定,由此产生数字型等位基因多态性分布。每个数字型分布对应一个序列分型(ST)。可通过网站(www.mlst.net和www.pubMLST.org)进行数据交换与查询,这些网站包含有屎肠球菌[109]和粪肠球菌[110]的MLST分型。MLST的应用揭示了屎肠球菌宿主特异性基因群的发生,并且识别了在多个地区均占主导地位的医院获得性屎肠球菌多克隆亚群(尤其是ST17、ST18、ST78和ST192),而且这与全球屎肠球菌分离率增加相关[27,35,43,50-51,111]。这种医院获得性群系最初被命名为"C1群",后来更名为"克隆群-17"(CC17),在那之后它被认为是所谓的高危肠球菌克隆群(HiRECC)。近期基因组序列的比对支持了医院相关进化枝在基因上与大多共生肠球菌存在差异这种观念[51]。应用MLST技术,已从医院获得的粪肠球菌分离株确定有两大主要克隆群(CC2和CC9)[106,110]。

2份同时发表的研究报告描述了关于粪肠球菌[112]和屎肠球菌[113]MLVA分型方法的进展。MLVA分型是基于分布在肠球菌基因组可变数目重复序列(VNTR)位点的变异。每个VNTR位点,重复的数目由串联重复序列的保守侧翼区设计的PCR引物决定。PCR产物通过琼脂糖凝胶进行分离,并且电泳条带的大小决定了重复序列的数量。这些数目都会在MLVA条带图像中显示出来,每个条带图对应一个MLVA型(MT)。比对研究表明,这2种技术都能高度区分不同菌株,且具有与基于PFGE的分型[106,110,114]相媲美的分辨力[114]。尽管这2种技术有明显的优势(重复性、方便性、高分辨率、清晰性),但MLST费时、昂贵且要求实验室同时有PCR仪和测序设备,而MLVA需要PCR仪和基本的电泳设备。

最近,采用下一代测序仪器进行全基因组测序(WGS)对包括细菌菌株分型[115-117]在内的一些微生物学研究来说已经成为一种具有经济效益且方便的方法。使用这个技术对肠球菌菌株进行基

因分型，以及其对人们理解肠球菌感染的流行病学产生的影响已有报道[115-117]。

十、血清学试验

已有血清学试验用于检测针对不同肠球菌抗原的抗体[118-119]，然而，临床实验室利用其对肠球菌感染的诊断和预后的有效性还未得到证实。另一方面，粪肠球菌和屎肠球菌的某些抗原被发现可引发保护性调理抗体的产生，这表明它们有希望作为开发主动或被动疫苗的靶标，能增加机体免疫力以对抗这些重要的医院病原体[34,120-121]。

十一、抗菌药物敏感性试验

对许多常见抗菌药物都具有耐药性是多数肠球菌的显著特点，尤其是粪肠球菌和屎肠球菌这 2 种与人类感染更相关的菌种。耐药性可分为天然耐药和获得性耐药。天然耐药与所有或大多数肠球菌中存在的固有或天然染色体编码特性有关。此外，对一些抗菌药物天然耐药的某些特定机制通常与某些特定的肠球菌种类或种群相关。相比之下，获得性耐药的发生就比较多变，原因可能是 DNA 发生突变或者通过质粒或转座子获得了新的耐药基因决定簇[27,30,33,122-123]。肠球菌天然耐药涉及的抗菌药物主要有两大类：氨基糖苷类和 β-内酰胺类抗菌药物。由于天然耐药导致一些抗生素对肠球菌无作用，对严重感染（如心内膜炎、脑膜炎和其他全身性感染）的治疗，特别是免疫功能低下的患者，建议组合使用抗菌药物，包括细胞壁激活剂，如 β-内酰胺类（通常是青霉素或氨苄西林）或万古霉素，加上氨基糖苷类抗菌药物（通常是庆大霉素或链霉素）。这些组合用药能抵抗肠球菌的天然耐药，并且具有协同杀菌作用，因为细胞壁激活剂能促进氨基糖苷类抗菌药物向细胞内渗透。

除了天然耐药特性，肠球菌获得了不同的基因决定簇使其对多种抗菌药物耐药，包括氯霉素、四环素类、大环内酯类、林可酰胺类、链霉素类、氨基糖苷类、β-内酰胺类、糖肽类、喹诺酮类，甚至是一些近期才使用的抗菌药物，如利奈唑胺、达托霉素和奎奴普丁-达福普汀[26,72,122-124]。过去的几十年中，肠球菌获得性耐药，尤其是对氨基糖苷类、β-内酰胺类抗菌药物高水平耐药（HLR），以及对糖肽类抗生素耐药（尤其是万古霉素）的报道越来越多。细胞壁激活剂耐药株或氨基糖苷类高耐药株能抵抗联合治疗的协同作用。因此，为了预测使用抗菌药物组合作为治疗策略达到协同作用的可能性，检测肠球菌对这些抗菌药物的耐药性是非常必要的。对氨基糖苷类抗菌药物高度耐药的肠球菌菌株在一些地理区域分离率非常高[26,72,123-125]。这些菌株通常 MICs＞2000 μg/ml，并且用常规纸片扩散法无法检测。含高浓度庆大霉素和链霉素纸片的特殊试验及单纯的稀释法可以用于筛查这种耐药类型[1,126]（见第 73 章和第 75 章）。

由于青霉素结合蛋白改变而对青霉素和氨苄西林高度耐药的菌株也已广泛传播[26-27,30,42,123-124]，而产 β-内酰胺酶的菌株很少发现[30,42]。氨苄西林药敏试验的结果可用于预测不产 β-内酰胺酶肠球菌菌株对阿莫西林、阿莫西林-克拉维酸、氨苄西林-舒巴坦、哌拉西林及哌拉西林-他唑巴坦的敏感性。如果对象是粪肠球菌，氨苄西林的药敏试验也可以用于预测亚胺培南的敏感性[126]。然而，肠球菌对青霉素的敏感性不能通过氨苄西林试验结果进行预测。如果要青霉素的药敏结果，就需要进行青霉素药敏试验。相反，对青霉素敏感的肠球菌可能对氨苄西林和上述的其他 β-内酰胺类抗菌药物敏感。用常规纸片扩散法或稀释法检测由于产生 β-内酰胺酶导致的青霉素和氨苄西林耐药结果并不可靠，需要进行基于头孢硝噻吩的 β-内酰胺酶试验[1,126]。

获得性万古霉素耐药株首次在西欧地区被报道，其出现成为治疗肠球菌感染的难题[127-128]。此后，陆续有 VRE 分离株的报道出现，显示了其在不同地理区域的流行情况[26-27,33,122-123,125]。VRE 分离株已根据其表型和基因特征进行了分类（表 24-3）。目前在肠球菌中有九种糖肽类耐药类型。每种类型与不同的基因型相关，有些可以进一步分成亚型。其中 3 种基因型最常见：VanA 表型由 *vanA* 基因编码，对万古霉素和替考拉宁诱导性高水平耐药；VanB 表型由 *vanB* 基因编码，仅对万古霉素有不同程度（中度-高度）的诱导性耐药；VanC 表型由 *vanC* 基因编码，赋予了万古霉素低水平的诱导性耐药。VanA 和 VanB 被认为是临床最常见耐药表型，并且通常与屎肠球菌和粪肠球菌耐药相关，而VanC耐药是鹑鸡肠球菌

表 24-3 肠球菌属对糖肽类抗生素耐药类型

特征	糖肽类抗生素的耐药类型								
	VanA	VanB	VanC	VanD	VanE	VanG	VanL	VanM	VanN
MIC(μg/ml)(耐药程度[a])									
万古霉素	64～1000(R)	8～1000(I/R)	2～32(S/R)	64～512(R)	8～32(I)	16(I)	8(I)	>256(R)	12～16(I)
替考拉宁	16～512(R)	0.5～1(S)	0.5～1(S)	4～64(S/R)	0.5(S)	0.5(S)	0.5(S)	64～>256(R)	0.5(S)
分级(水平)	高度	可变	低度	中度	低度	低度	低度	可变	低度
基因型	*vanA*	*vanB*[b]	*vanC*[b]	*vanD*[b]	*vanE*	*vanG*[b]	*vanL*	*vanM*	*vanN*
可移动基因元件	Tn1546	Tn1547 或 Tn1549-Tn5382	未知	未知	未知	未知	未知	未知	未知
可接合性	+	+	−	−	−	+	−	+	+
van 基因位置	质粒,染色体	质粒,染色体	染色体	染色体	染色体	染色体	染色体	质粒	质粒
表达类型	诱导型	诱导型	结构型	结构型	诱导型	诱导型	诱导型	诱导型	结构型
基因表达产物(修饰靶基因)[c]	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Lac	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser	D-Ala-D-Ser[d]	D-Ala-D-Lac[d]	D-Ala-D-Ser[d]
菌种分布	粪肠球菌、屎肠球菌、鸟肠球菌、铅黄肠球菌、耐久肠球菌、鹑鸡肠球菌、海氏肠球菌、蒙氏肠球菌、棉子糖肠球菌、泰国肠球菌	粪肠球菌、屎肠球菌、耐久肠球菌、鹑鸡肠球菌	铅黄肠球菌、鹑鸡肠球菌	粪肠球菌、屎肠球菌、鸟肠球菌、鹑鸡肠球菌、棉子糖肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌	粪肠球菌	屎肠球菌	屎肠球菌

注:[a]R. 耐药;S. 敏感;I. 中介。[b]亚型包括:*vanB1-vanB3*;*vanC1-vanC4*;*vanD1-vanD5*;*vanG1* 和 *vanG2*。[c]D-Ala-D-Lac,D-丙氨酸-D-乳酸;D-Ala-D-Ser,D-丙氨酸-D-丝氨酸。[d]推测的产物,未经确认

(*VanC*1 基因型)和铅黄肠球菌(*VanC2*-*VanC4* 基因型)的天然耐药特征[33, 122-123]。由 *vanD*、*vanE*、*vanG*、*vanL*、*vanM* 和 *vanN* 基因[122-123, 129]编码对糖肽类耐药的其他型别,在肠球菌中非常罕见。

此外,从临床上分离出万古霉素不均一耐药株[130],万古霉素依赖性[131]和万古霉素耐受性[132]的肠球菌菌株,尽管仅有零星报道,也意味着可能会对肠球菌感染治疗和控制带来严重的威胁。

虽然检测万古霉素耐药的体外试验已经在参考文献[1]和[126],以及本书第 73 章和 75 章进行了详细讨论,但关于 *vanC* 携带株(如鹑鸡肠球菌和铅黄肠球菌)的一些方面还需要强调一下。与 *vanC* 基因型相关的耐药无法用纸片扩散法检测,但 VanC 菌株往往能在万古霉素琼脂平板上生长。由于 VanC 耐药的临床意义不大,药敏试验对患者治疗的影响可能还不是很清楚。然而,从 VanC 菌株中区分 VanA 和 VanB 菌株,以及其他不常见类型的获得性万古霉素耐药株,对于临床治疗、感染控制和密切监视非常有必要。由于在万古霉素筛选琼脂平板上生长不能帮助其进行区分,因此有必要进行菌种的鉴定。在实际应用中,粪肠球菌或屎肠球菌在万古霉素筛选琼脂平板上生长可能是由于存在 *vanA* 或 *vanB* 基因。但也应考虑出现万古霉素耐药的其他种类,尽管比较罕见。此外,越来越多的报道发现 *vanC* 携带株(铅黄肠球菌,尤其是鹑鸡肠球菌)同时带有 *vanA* 基因,因此,鉴定通常只有 VanC 耐药的菌种不能完全排除万古霉素中度到高度耐药[31, 46]。鉴于这样,检测万古霉素的 MICs 非常必要,VanC 耐药通常 MICs $<32\ \mu g/ml$,而 VanA 和 VanB 的 MICs 通常$>32\ \mu g/ml$。在这种情况下,确定与万古霉素耐药有关的基因元件对流行病学和感染控制有重要意义。同时,VanC 耐药株很少见对其他抗生素如氨苄西林和氨基糖苷类抗生素耐药。对几种目前可用药物的耐药性的发展凸显了临床医生在某些肠球菌感染中所面临的困难,并需要使用涉及新旧抗菌药物的新的或创新的治疗方法。由于选择有限,VRE 菌株可进行氯霉素、红霉素、四环素(或多西环素、米诺环素)和利福平的药敏试验。对万古霉素耐药的屎肠球菌,可根据感染部位,选择性地进行奎奴普丁-达福普汀、利奈唑胺、替吉环素和达托霉素的药敏试验[72,125]。

分子生物学方法(第 79 章)已被用于检测特异性的耐药基因,并且有助于充分理解肠球菌获得性耐药的传播,尤其对万古霉素的耐药。然而,每种药物的耐药都具有独特性,分子生物学方法不能检测该测试靶向机制以外的耐药,包括一些新出现的耐药机制。

十二、结果的评价、解释和报告

肠球菌获得性耐药株多样性和菌株特异性要求临床实验室给临床提供准确菌种鉴定的同时,提供准确的抗生素体外药敏结果。特定肠球菌分离株的临床重要性是决定何时需要做药敏试验的主要因素。一旦决定需要对某个特定的菌株进行药敏试验,其抗生素的选择需要根据感染部位进行考虑。对于存在天然耐药的肠球菌不宜做药敏试验。不应报告包括标准浓度的氨基糖苷类、头孢菌素、克林霉素和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑的药敏结果。对天然耐药的肠球菌来说这些抗生素可能在体外试验是敏感的,但临床使用完全无效,因此不能报告肠球菌对这些药物敏感。应根据最新指南[126]选择抗生素并进行常规的药敏试验和报告。肠球菌耐药性的体外检测方法在参考文献[1]中进行了综述和总结,并在本书第 73 章、第 75 章进行了讨论。

正如已提到的,对所有需要进行联合治疗的肠球菌感染如全身感染,需要做氨基糖苷类抗生素高度耐药试验,它可以预测药物协同作用的效果。胃肠道或浅表伤口感染的住院患者常检测到肠球菌参与多重细菌感染。这种情况下肠球菌的致病意义还不确定,但当检测到其中肠球菌占主要或优势生长时,也需要做药敏试验。下尿路感染分离到的粪肠球菌可选择性进行药敏试验,因为这些感染通常对氨苄西林或呋喃妥因治疗有效。然而,许多医院感染控制策略把 VRE 的常规检测纳入监测程序的一部分。例如,当需要对泌尿道分离菌株进行药敏试验时,除了呋喃妥因和氨苄西林,还可选择环丙沙星、磷霉素、左氧氟沙星、诺氟沙星和四环素[31, 33, 126]。特别是在治疗失败情况下,以上药敏试验非常有必要。

参考文献请扫二维码查阅

第25章　气球菌属、乏养菌属和其他需氧的触酶阴性革兰阳性球菌

JENS JØRGEN CHRISTENSEN，XIAOHUI CHEN NIELSEN，KATHRYN L. RUOFF

（白志宇　译；许建成、倪语星　审校）

一、分类

本章介绍的需氧、触酶阴性革兰阳性球菌形成分类学上的几个菌群，临床分离时并不常见，是引起感染的条件致病菌。大多数与其他几种熟知的临床分离菌（如链球菌属和肠球菌属）很相似，因此可能会混淆。虽然过去有可能误鉴定或在临床培养中被忽视，但此类细菌在免疫缺陷患者中的致病性正为人们所认识。表25-1列出了这些细菌及其部分基本特征。在本章讨论的细菌是硬壁菌门（phylum Firmicutes）（低G+C，革兰阳性菌）的成员。除了创伤球菌属（*Helcococcus*）（梭菌纲）和孪生球菌属（*Gemella*）（芽胞杆菌目），这些菌属将归类为"*Bacilli*"纲和乳杆菌目（Lactobacillales）[1-2]。乳杆菌目包括气球菌科（*Aerococcaceae*）、肉杆菌科（*Carnobacteriaceae*）、肠球菌科（*Enterococcaceae*）、乳杆菌科（*Lactobacillaceae*）、明串珠菌科（*Leuconostocaceae*）和链球菌科（*Streptococcaceae*）。在本章提到的属于这些科的是气球菌属（*Aerococcus*）、乏养菌属（*Abiotrophia*），费克蓝姆菌属（*Facklamia*），以及所谓的小属狡诈球菌属（*Dolosicoccus*）、*Eremococcus*、圆短链菌属（*Globicatella*）和懒惰菌属（*Ignavigranum*）（在气球菌科中），差异球菌属（*Alloiococcus*）、狡诈菌属（*Dolosigranulum*）和颗粒链菌属（*Granulicatella*）（在肉杆菌科中），四联球菌（*Tetragenococcus*）和漫游球菌属（*Vagococcus*）（在肠球菌科中），片球菌属（*Pediococcus*）（在乳杆菌科中），明串珠菌属（*Leuconostoc*）和魏斯菌属（*Weissella*）（在明串珠菌科中），乳球菌属（*Lactococcus*）（在链球菌科中）。有关黏滑罗氏菌（*Rothia mucilaginosa*）的信息可参见第22章，该菌为另一种不常分离到的革兰阳性球菌，触酶可能为阴性。

乳球菌属原先归属于兰氏N群链球菌[3]。据报道其中的乳乳球菌（*Lactococcus lactis*）和加氏乳球菌（*Lactococcus garvieae*）可引起人类感染。含兰氏N群抗原（一种磷壁酸抗原）且有动力的类似于乳球菌属的菌种现归于漫游球菌属[4-5]。漫游球菌与肠球菌也很相似，正如Facklam和Elliott文章所述[6]。

乏养菌属和颗粒链菌属包含以前称之为营养变异链球菌或卫星链球菌的细菌[7,8]。最初认为这些细菌是草绿色链球菌群的营养突变体，尤其是缓症链球菌（*Streptococcus mitis*）的营养突变体。Bouvet及其团队[9]认为这群细菌确实为2种新的链球菌，并将其命名为缺陷链球菌（*Streptococcus defectivus*）和毗邻链球菌（*Streptococcus adjacens*）。Kawamura的团队通过16S rRNA基因序列对比分析，提议该细菌应为新的菌属，并命名为乏养菌属，该属有2个菌种，分别为缺陷乏养菌（*Abiotrophia defectiva*）和毗邻乏养菌（*Abiotrophia adiacens*）[8]。1998年发现该属人源性第3个菌种细长乏养菌（*Abiotrophia elegans*）[10]。Kanamoto等指出，乏养菌株中有的具有异质性，并提议了第4个种副毗邻乏养菌（*Abiotrophia paraadiacens*）[11]。2000年，Collins和Lawson提出了一个新的菌属颗粒链菌属，并将原来乏养菌属中的毗邻乏养菌和苛养颗粒链菌归入本属，分别改名为毗邻颗粒链菌（*Granulicatella adiacens*）和细长颗粒链菌（*Granulicatella elegans*）。缺陷乏养菌则仍然为乏养菌属的唯一菌种[7]。

表 25-1 根据明确的生化反应和细胞分子学推断触酶阴性、革兰阳性球菌可能的鉴定结果[a]

生化反应			细胞分子学	
PYR	LAP	NaCl	成对，成链	成双，四联，不规则团块
+	+	+	肠球菌属，[b,c,d] 漫游球菌属，[c,e] 乳球菌属，[d] 费克蓝姆菌属（除外惰性费克蓝姆菌），懒惰菌属[f]	惰性费克蓝姆菌，狡诈菌属，栖血气球菌
+	+	−	乏养菌属，[g] 颗粒链菌属，[g] 孪生球菌属某种（除外溶血孪生球菌和不解糖孪生球菌）	溶血孪生球菌（主要成对排列，相邻一端平坦）
+	−	+	圆短链菌属	浅绿色气球菌，[h] 孔兹创伤球菌[i,j]
+	−	−	狡诈球菌属	
−	+	+		尿气球菌，片球菌属，[k] 四联球菌属
−	+	−	草绿色链球菌，[l] 不解糖孪生球菌（*G. assacharolytica*）	
−	−	+	明串珠菌属，[j] 魏斯菌属[k]	

注：[a] PYR. 吡咯烷酮芳胺酶试验；LAP. 亮氨酸氨肽酶试验；NaCl. 6.5%NaCl 生长；+. ≥90%菌株阳性；−. ≤10%菌株阳性。[b] 一些菌株对万古霉素耐药，一些菌株具有活力。[c] 大多数肠球菌可以在 45℃条件下生长，这有别于与之表型可能相似的漫游球菌属。报道称，用商品化的肠球菌属菌株的核酸探针检测漫游球菌属为阳性。[d] 表型相似的肠球菌和乳球菌可通过商品化的肠球菌属菌株的核酸探针检测鉴别。[e] 有活力。[f] 有些菌株呈卫星状生长；有些菌株呈脲酶阳性。[g] 该属部分菌株呈卫星生长现象。[h] 2 株新增的孪生球菌属，副溶血孪生球菌（*Gemella parahaemolysans*）和台湾孪生球菌（*Gemella taiwanensis*），类似于溶血孪生球菌。详细信息可见参考文献[22]。[i] 尽管孔兹创伤球菌和绿色气球菌有部分共同的表型特性，但其兼性厌氧、不溶血，而绿色气球菌更倾向于需氧生长、α-溶血。[j] 人们从单个菌株中分离出另外的两种盐球菌属（瑞典创伤球菌和化脓创伤球菌）[36-38]。这些新的菌种与孔兹创伤球菌相反，呈 PYR 阴性。[k] 万古霉素耐药。[l] 草绿色链球菌分为咽峡炎链球菌群、温和链球菌群、变异链球菌群、唾液链球菌群、牛链球菌群。有些肺炎链球菌（温和链球菌群的一种）可能呈现 PYR 阳性。

译者注：表格倒数第 2 行不解糖孪生球菌的拉丁文名称，印刷错误。应该是 *Gemella asaccharolytica*，而不是 *Gemella assacharolytica*。后一个单词第 2～5 个字母印刷错误

在万古霉素天然耐药的触酶阴性、革兰阳性球菌中，一些明串珠菌菌种引起的人类感染已见报道[肠膜样明串珠菌（*Leuconostoc mesenteroides*）、乳明串珠菌（*Leuconostoc lactis*）、假肠膜明串珠菌（*Leuconostoc pseudomesenteroides*）和柠檬明串珠菌（*Leuconostoc citreum*）[12]]。1993 年，此前命名的 *Leuconostoc paramesenteroides* 及相关菌种归入新的菌属魏斯菌属[13]。乳酸片球菌（*Pediococcus acidilactici*）和戊糖片球菌（*Pediococcus pentosaceus*）是临床最常见的片球菌属菌种[14]。曾称为嗜盐片球菌（*Pediococcus halophilus*），对万古霉素敏感的菌种重新分类归入四联球菌属[15]。原名为孤立肠球菌（*Enterococcus solitarius*）的细菌也归类于四联球菌属，并命名为孤独四联球菌（*Tetragenococcus solitarius*）[16]。而目前人们对四联球菌在人类感染中的作用知之甚少。

人们所熟知的麻疹孪生球菌（*Gemella morbillorum*）于 1917 年由 Tunnicliff 报道，该菌株分离自麻疹患者的血液[17]。麻疹孪生球菌最初命名为麻疹孪生双球菌（*Diplococcus rubeolae*），也称为麻疹孪生双球菌（*Diplococcus morbillorum*）、麻疹消化链球菌（*Peptostreptococcus morbillorum*）和麻疹消化链球菌（*Streptococcus morbillorum*），直到 1988 年，有人提议将其归入孪生球菌属，命名麻疹孪生球菌[18]。第 2 个菌种，溶血孪生球菌（*Gemella haemolysans*），由于其革兰染色可变甚至阴性，及其细胞形态特点（坦面相邻的双球菌），最初归为奈瑟菌属（*Neisseria* species）。Collins 及其同事报道了人源性的另外 2 种孪生球菌属菌种，伯杰孪生球菌（*Gemella bergeri*）（原名 *Gemella bergeriae*[19]）和血孪生球菌（*Gemella sanguinis*）[20]。Ulger-Toprak 及其同事描述不解糖孪生球菌（*Gemella asaccharolytica*）[21]，Hung 和同事[22]最近报道了从人类临床标本中分离出 2 个新的种，副溶血孪生球菌（*Gemella parahaemolysans*）和台湾孪生球菌（*Gemella taiwanensis*）。狡诈菌属与孪生球菌属尽管没有密切的亲缘关系，但两者表型相似[23-24]。

尿气球菌（*Aerococcus urinae*）于 1992 年见诸

报道，表现为吡咯烷酮芳胺酶试验（pyrrolidonyl arylamidase production，PYR）阴性、亮氨酸氨肽酶试验（leucine aminopeptidase production，LAP）阳性，这 2 种重要的鉴定试验结果与浅绿色气球菌（*Aerococcus viridans*）相反[25-26]。柯氏气球菌（*Aerococcus christensenii*）分离自人类泌尿生殖道，于 1999 年由 Collins 及其同事报道[27]，并在 2001 年栖血气球菌（*Aerococcus sanguinicola*）（原名 *Aerococcus sanguicola*[28-29]）和人尿气球菌（*Aerococcus urinaehominis*）[30] 纳入气球菌属。这五种气球菌标准菌株的全基因组序列已经获得[31]。另外 2 种非人类来源的猪气球菌（*Arococcus suis*）（2007 年）和阴道气球菌（*Aerococcus vaginalis*）（2014），分别从养猪场和奶牛分离出来，已归入属[32]。

圆短链菌属、费克蓝姆菌属、懒惰菌属和狡诈球菌属是 4 种相关菌属，但很少从临床标本中分离到。原名为 *Globicatella sanguis* 的血圆短链菌（*Globicatella sanguinis*）于 1992 年发现[33]。费克蓝姆菌属目前包括 4 个临床菌种：人费克蓝姆菌（*Facklamia hominis*[34]）、稍氏费克蓝姆菌（*Facklamia sourekii*[35]）、懒惰费克蓝姆菌（*Facklamia ignava*[36]）和惰性费克蓝姆菌（*Facklamia languida*[37]）。Collins 及其同事发现，懒惰菌属目前只有一个菌种，即 *Ignavigranum ruoffiae*[38]，狡诈球菌属亦只有一个菌种，即少食狡诈球菌（*Dolosicoccus paucivorans*[39]）。

创伤球菌属原先只有一个种，即孔兹创伤球菌（*Helcococcus kunzii*）[40]，2004 年，又新增一个人源性菌种瑞典创伤球菌（*Helcococcus sueciensis*）[41]。第 3 个人源性菌种化脓创伤球菌（*Helcococcus pyogenes*）尽管已提议纳入，但至今未获得官方分类认可[42]。分离自感染动物体内的绵羊创伤球菌（*Helcococcus ovis*）呈卫星状生长，这一点与人源性创伤球菌属菌种不同[43]。

二、属的描述

本章介绍的细菌均为革兰阳性球菌。但是溶血孪生球菌（*G. haemolysans*）由于其菌体易脱色而表现为革兰染色可变或阴性。依据细胞形状和排列可将这些细菌分成两大类：一类为革兰染色（成对和成链的球杆菌）链球菌样细菌，另一类为革兰染色葡萄球菌样细菌（较多的圆球形成对、四联、成簇或不规则的球菌）。基于细胞形状和排列将这些不同的细菌分成两类的方法仅用于协助细菌鉴定，分群就意味着它们之间并没有相关性。乏养菌属和颗粒链菌属（原营养变异链球菌）菌体为成对、成链排列的球杆菌，这些细菌也可出现多形性，特别在次优营养条件下生长时[44]。除不常分离到的漫游球菌属外，这些细菌都没有动力。在本章描述的大部分菌属都是触酶阴性的兼性厌氧菌，但浅绿色气球菌分类属于微需氧菌，在绝对厌氧条件下生长不良。有些气球菌属菌株因其非血红蛋白触酶的活性可能呈现触酶弱阳性。除溶血孪生球菌、伯杰孪生球菌和血孪生球菌菌落在马血平板上可有 β-溶血外，其他所有菌属在常规血平板上无 β-溶血[19-20,45]。

三、流行病学和传播

本章讨论的细菌是条件致病菌。许多菌属是人类口腔、上呼吸道（孪生球菌属、乏养菌属和颗粒链菌属）和皮肤（创伤球菌属）的正常菌群。乳球菌属、片球菌属、明串珠菌属可分离自食物和蔬菜，也是消化道正常菌群的一部分[6]。气球菌属是环境分离菌，也可在人的皮肤上发现。虽然这些细菌可从临床标本中分离，但这些菌的寄生部位还不明确。在本章所述细菌似乎是低毒力的，通常只在免疫缺陷宿主中致病。感染常发生于此前损伤的组织（如心脏瓣膜）中，可能是医源性的，常与长期住院、抗生素治疗、侵入性操作和异物置入等因素有关。

四、临床意义

在本章所述细菌可能是临床培养的污染菌，但偶尔也可作为条件致病菌分离到。血、脑脊液、尿和伤口标本可能是分离到这些细菌有意义分离株的标本。各属引起感染的报道详见下文。

（一）乏养菌属和颗粒链菌属

乏养菌属和颗粒链菌属（原名营养变异链球菌）的菌种既是口腔中的正常菌群，也是引起自体瓣膜和人工瓣膜心内膜炎的致病菌[46-47]。这些病

原菌也已分离自其他类型的感染，包括眼部感染[48-49]、中枢神经系统感染[50-51]、持续不卧床腹膜透析导致的腹膜炎[52]、肌肉骨骼感染[53]、脓毒性关节炎[54]和隆胸相关感染[55]。

(二)气球菌属

曾记载浅绿色气球菌是临床培养物的污染菌，少数有临床意义的分离株，见于从数例心内膜炎、菌血症和1例椎间盘炎的病例报道[56-57]。来自人类的其他4个气球菌属菌种自1990年初已有报道。据报道，尿气球菌[58]是易感患者尿路感染的病原体[大约1/2的患者有易感因素，或是全身性基础疾病(尤其是糖尿病和癌症)，或是局限性(留置导管或是前列腺增生)]，也是心内膜炎[59]、淋巴结炎[60]和腹膜炎[61]的病原体。栖血气球菌可从血和尿标本中分离到[28-29]，也有从尿毒症和心内膜炎患者中分离[59]的病例报道。来源于尿路感染、菌血症、感染性心内膜炎发作期的8株临床栖血气球菌和40株临床尿气球菌已经行全基因组测序，并对其致病基因的基因组多样性及特性分析，发现与细菌的致病力有关[62]。与细菌黏附力相关的致病基因(栖血气球菌：*htpB*、*fbpA*、*lmb*和*ilpA*；尿气球菌：*htpB*、*lap*、*lmb*、*fbp-54*和*ilpA*)和抗吞噬作用(荚膜多糖基因同源物)的致病基因得到了鉴定。目前对柯氏气球菌(分离于阴道标本[27])和人尿气球菌(分离于尿[30])的临床意义知之甚少。

(三)狡诈球菌属

狡诈球菌属的唯一菌种是少食狡诈球菌，已从血培养中分离到[39,63]。

(四)狡诈菌属

狡诈菌属与孪生球菌属尽管表型相似，但并没有密切的亲缘关系[23]。文献记载狡诈菌属可从血、眼和呼吸道标本[24]中分离到。本属中唯一的菌种懒惰狡诈菌(*Dolosigranulum pigrum*)与下列疾病相关：医院获得性肺炎和脓毒症[64]、滑膜炎[65]、急性胆囊炎伴急性胰腺炎[66]、植入物相关的关节炎[67]。

(五)费克蓝姆菌属

费克蓝姆菌属与圆短链菌属亲缘关系密切，但表型与系统发育明显不同[34]。迄今确认的4种费克蓝姆菌属临床分离菌来自于血、伤口、泌尿生殖道[34-37]和1例羊膜绒毛膜炎患者[68]。

(六)孪生球菌属

溶血孪生球菌已经从心内膜炎[69]、脑膜炎[70]、脑脓肿[71]、全膝关节置换术[72]、眼部感染[73-75]病例中分离到。麻疹孪生球菌已有报道从心内膜炎[76]、脓胸和肺脓肿[77]、感染性休克[78]、脑脓肿[79]、骨髓炎[80]、脓毒性关节炎[81]、腹膜炎[82]病例中分离到。还在继续累积其他有临床意义的孪生球菌属菌种的信息。伯杰孪生球菌和血孪生球菌已从血液培养中分离到，也可能是心内膜炎的致病菌[19-20,83]。据报道，一株血孪生球菌已分离于感染的髋关节假体[84]，不解糖孪生球菌已从伤口培养物中分离出[21]。副溶血孪生球菌和台湾孪生球菌已经从血培养分离出[22]。

(七)圆短链菌属

血圆短链菌(*G. sanguinis*)可从人类临床标本中分离到，已从菌血症、尿路感染和脑膜炎病例中分离到[33,85-86]。圆短链菌属的第2个菌种产硫化物圆短链菌(*Globicatella sulfidifaciens*)已从家畜哺乳动物的化脓性感染标本分离出[87]。

(八)创伤球菌属

孔兹创伤球菌可从下肢完整的皮肤中分离到，也可从混合伤口培养物，特别是足部感染中分离到[40]。但在此情况下，该菌的临床意义较难解释，因其可能仅仅作为伤口部位的定植菌存在。尽管孔兹创伤球菌的功能可能是条件致病菌，但在某些感染中也可能是唯一或主要的病原体，包括皮肤和软组织脓肿、菌血症、脓胸、人工关节感染和脑脓肿[88]。其他2个来自人类的致病菌“瑞典创伤球菌”和“化脓创伤球菌”分别是伤口感染和人工关节感染的唯一分离株[41-42]。

(九)懒惰菌属

迄今为止，懒惰菌属中唯一的菌种，*I. ruoffiae*分离数量较少。其分离部位包括伤口和耳部脓肿[34]。

(十)乳球菌属

由于其表型与链球菌和肠球菌相似，乳球菌

临床分离株在过去可能会混淆，这可能是关于乳球菌临床感染报道缺少的原因。Elliott及其同事[89]研究了分离自血、尿路感染、眼部损伤培养物的一些乳球菌菌株的表型特征。已证实乳球菌属与下述感染相关：天然瓣膜和人工瓣膜心内膜炎[90]、免疫缺陷患者的脓毒症、骨髓炎、椎间盘炎[90]、腹膜炎[91]、肝脓肿[92-93]、非结石性胆囊炎[94]和人工关节感染[95]。加氏乳球菌是水产养殖鱼类的已知病原体，食用或接触水产养殖鱼可导致人感染此菌[90,95]。

(十一)明串珠菌属

明串珠菌属、片球菌属和魏斯菌属是触酶阴性、革兰阳性球菌中对万古霉素天然耐药的3个属。20世纪80年代中期对万古霉素耐药的明串珠菌属和片球菌属首次在临床标本中确认。Handwerger及其同事[96]观察到宿主防御功能损伤、穿破表皮的侵入性操作、胃肠道症状和先前抗生素治疗是成人感染明串珠菌属的共性特征。该研究还报道了新生儿对明串珠菌属菌血症的易感性，这表明新生儿经母体生殖道分娩时，可能让居于母性生殖道的明串珠菌属定植。明串珠菌属已从血液、脑脊液、腹膜透析液、伤口中分离到。病例报道提示串珠菌属是骨髓炎[97]、脑室炎[98]、脑脓肿[99]、术后眼内炎[100]和短肠综合征导致菌血症的病原体。短肠综合征有利于富含乳杆菌属和明串珠菌属的微生物群繁殖[101]。一些文献报道明串珠菌属菌血症发作与短肠综合征、中央静脉插管和肠黏膜损伤等存在有关[102]。

(十二)片球菌属

片球菌属已从菌血症、免疫缺陷患者中的脓毒症、肝脓肿病例里分离到[103-104]。Barros及其同事[14]报道乳酸片球菌比戊糖片球菌更常从临床标本中分离，在菌血症病例中也更多见。Barton及其同事报道了片球菌属在胃肠道畸形需手术矫正的新生儿菌血症中的作用[105]。

(十三)漫游球菌属

到目前为止，文献中只报道了少量分离自人体的漫游球菌属分离株。Teixeira及其同事[106]报道了分离自血、腹水和伤口的漫游球菌属菌株。Al-Ahmad及其同事报道了从感染的根管系统中分离的河流漫游球菌(*V. fluvialis*)菌株[107]。漫游球菌属有动力，与乳球菌属类似，含有兰氏N群抗原[6]。漫游球菌属鉴定困难，部分原因是由于其在临床培养中不常见。

(十四)魏斯菌属

过去将混乱魏斯菌(*Weissella confusa*)归为混乱乳杆菌(*Lactobacillus confusus*)，现已报道混乱魏斯菌为菌血症、心内膜炎的不常见分离菌[108]。

五、样本的采集、运输和储存

本章所讨论细菌分离的标本采集和运送没有特殊要求，方法如前所述。因这些细菌大多是兼性厌氧或微需氧菌，所以需氧培养常规条件下收集、运输、储存即可完成这些菌的分离。这些细菌也可在厌氧条件下收集和运输的标本中分离到(第19章)。

六、直接检查

在本章所述细菌可从临床标本的直接革兰染色中观察到，但并没有明显的形态特点与常见的革兰阳性球菌(链球菌和葡萄球菌)区分。虽然乏养菌属和颗粒链菌属分离菌在直接革兰染色中呈多形性，但这些细菌在营养充足的培养基中生长可表现为成对、成链的革兰阳性球菌。目前还未见直接检测这些菌属的抗原方法。一些研究者已使用16S rRNA基因扩增与测序法和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS)从临床标本中直接或快速检测这些菌属[109-111]。

七、分离步骤

一般来说，在本章所述细菌群的分离没有特殊要求，应当遵循血液、体液和其他标本培养的一般推荐(第19章)。由于这些细菌对营养要求较高，因此应使用营养丰富的非选择性培养基(如血液或巧克力琼脂或巯基乙酸盐肉汤)进行培养。若需要选择性分离对万古霉素耐药的明串珠菌

属、片球菌属，可使用 Thayer-Martin 培养基，该培养基可抑制正常菌群或其他污染的细菌[112]。某些菌属（如创伤球菌属）生长缓慢，形成的微小菌落不易辨认，应延长培养时间至 48～72 h。在本章所述的许多菌属在 CO_2 条件下可促进其生长。乏养菌属和颗粒链菌属的菌种通常可在巧克力琼脂、含 5%马血的布鲁菌琼脂、巯基乙酸盐肉汤中生长，但不能在含 5%羊血的胰酶大豆琼脂上生长。该类菌可在非支持培养基中适当增加补充物后培养（见后述乏养菌属和颗粒链菌属的表型鉴定流程）。

八、鉴定

（一）表型分化流程

在临床实验室中遇到不常分离的需氧生长、触酶阴性的革兰阳性球菌时，可使用分子生物学方法准确鉴定到菌种水平，但表型方法有助于将这些细菌鉴定到属的水平。革兰染色形态学已作为革兰阳性球菌鉴定流程中的重要一环（图 25-1、图 25-2 和表 25-1）将球菌分为 2 类，一类为链球菌样细菌，即成对或成链排列的球菌或球杆菌；另一类为葡萄球菌样细菌，即成对、成簇、四联或不规则排列的球状菌。肉汤（巯乙酸盐肉汤为好）中生长的细菌可用来做形态学辨认。但应注意的是，李生球菌属和费克蓝姆菌属中各菌种的细胞形态类型不尽相同。图 25-1 和图 25-2 列出了在本章所述细菌菌属鉴别的表型试验。其中触酶试验、PYR、LAP、β-葡糖醛酸糖苷酶试验（β-glucuronidase）、马尿酸盐水解试验（hippurate hydrolysis）、胆汁七叶苷琼脂（bile esculin agar）和乳杆菌属 MRS 肉汤培养基（DeMan，Rogosa，Sharpe）试验详见第 20 章和参考文献[6]。其他的表型鉴定试验参照以下各个菌属的鉴定标准。

1. 乏养菌属和颗粒链菌属 卫星试验是区分这 2 个菌属的重要依据。将待检菌密集划线接种于其不生长或生长不良的培养基上（如绵羊血琼脂平板）。金黄色葡萄球菌（ATCC 25923 或其他合适菌株）于接种区划十字。35℃富含 CO_2 的环境下孵育，乏养球属或颗粒链菌属的菌株只在葡萄球菌附近生长。懒惰菌属的某些菌株也可表现出卫星现象[38]。同样，培养基中添加吡哆醛（pyridoxal）也可用于检测卫星现象。将除菌过滤的 0.01%盐酸吡哆醛贮存液（可冻存）添加于培养基中，使其终浓度为 0.001%。也可用吡哆醛纸片检测卫星现象。对于 PYR 和 LAP 阳性的乏养菌属和颗粒链菌属菌种的详细表型信息可参阅参考文献[7][44][113]和[114]。

2. 气球菌属 气球菌属中的浅绿色气球菌 PYR 阳性、LAP 阴性，在厌氧条件下生长不良或不生长[115]。将待测菌接种于 2 块血平板上，分别置厌氧和需氧环境下孵育，24～48 h 后比较两平板上生长情况，以验证厌氧特性。浅绿色气球菌形成 α-溶血菌落，此种菌落易与浅绿色链球菌或肠球菌混淆。栖血气球菌 PYR 和 LAP 均阳性，而人尿气球菌均阴性。PYR 阴性、LAP 阳性的菌种尿气球菌和柯氏气球菌可用 β-葡糖醛酸糖苷酶试验鉴别（柯氏气球菌为阴性，尿气球菌为阳性）。尿气球菌在血琼脂培养基上形成 α-溶血、凸起、光亮、透明的小菌落（孵育 24 h 后直径达 0.5 mm）。尿气球菌鉴定特性的其他信息可参阅参考文献[116]，该菌种的第二个生物型（七叶苷水解试验阳性）可参阅参考文献[26]。柯氏气球菌、栖血气球菌和人尿气球菌菌种表型特征的其他信息可见表 25-1、图 25-2 和参考文献[27-30]。

3. 狡诈菌属 至今为止，懒惰狡诈菌是狡诈菌属发现的唯一菌种，显示为 PYR 和 LAP 阳性，最初认为与孪生球菌属菌种的表型相似，尽管两者亲缘关系并不密切[23]。狡诈菌属由于水解精氨酸的能力及可在 6.5% NaCl 培养基中生长，可与孪生球菌属菌种相鉴别。

4. 孪生球菌属 孪生球菌属成员（通常 PYR 阳性）在羊血琼脂培养基上形成与草绿色链球菌外形相似的小菌落。某些孪生球菌属菌株生长缓慢，易与乏养菌属或颗粒链菌属（原名营养变异链球菌）这些菌混淆。卫星试验可区分这 2 类细菌[117]，但是 Leung 及其同事[84]报道了一株血孪生球菌表现出“伪卫星现象”（孵育 24 h 后出现卫星菌落，但培育超过 48 h 后在培养基上广泛生长）。溶血孪生球菌菌体易脱色，因其成对排列、坦面相邻，故形似奈瑟菌属。该菌易在有氧环境下生长。七叶苷水解试验可鉴别溶血孪生球菌和黏滑罗氏菌（图 25-2），将待测菌接种于七叶苷琼脂斜面上（心浸出液琼脂中添加0.1%七叶苷及

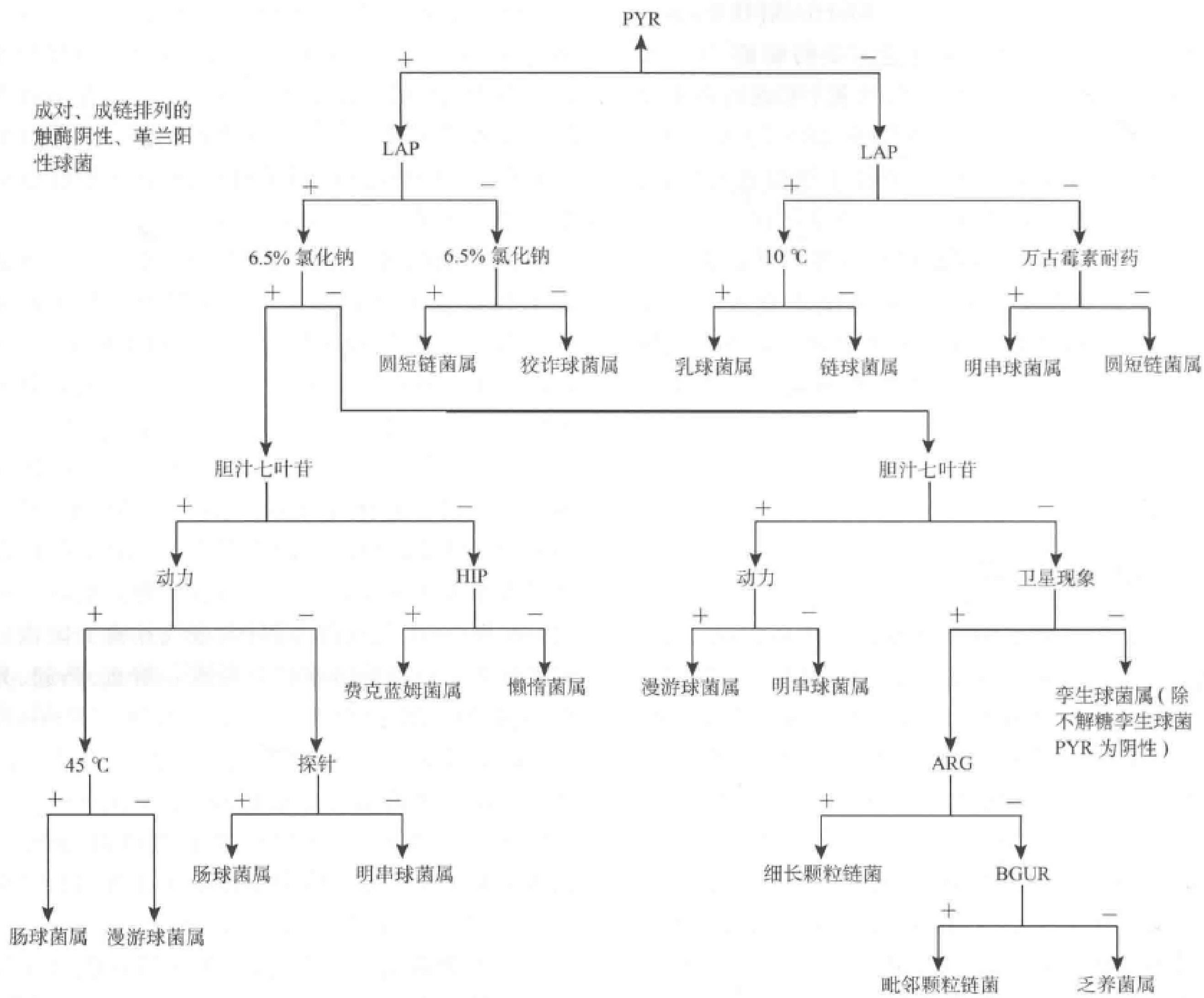


图 25-1 成对、成链排列的触酶阴性、革兰阳性球菌的鉴定流程

注：PYR. 吡咯烷酮芳胺试验；LAP. 亮氨酸氨肽酶试验；6.5% NaCl. 6.5% NaCl 生长试验；45℃. 45℃生长；10℃. 10℃生长；HIP. 马尿酸盐水解试验；ARG. 精氨酸水解试验；BGUR. β-葡糖醛酸糖苷酶试验；胆汁七叶苷为 40%胆汁培养基的七叶苷水解试验；动力为动力试验培养基中的动力检测；探针为与上市商品肠球菌属核酸探针反应；卫星现象为卫星样生长现象

0.5%枸橼酸铁)，35℃培养，最多至 7 天。琼脂部分或全部变黑视为结果阳性[6]。麻疹孪生球菌为革兰阳性菌，成对或短链状排列，但某些成对细菌可能表现为大小不等。此前只有对伯杰孪生球菌和血孪生球菌的少数菌株有过类似报道。孪生球菌属各菌种表型特征信息可见参考文献[19]和[20]。最近有报道称与孪生球菌属的其他菌种有所不同，不解糖孪生球菌为 PYR 阴性[21]。副溶血孪生球菌和台湾孪生球菌的表型特征总结可见文献[22]。

5. 圆短链菌属及相关菌属(费克蓝姆菌属、狡诈球菌属及懒惰菌属) 除产硫化物圆短链菌菌种外，圆短链菌属及相关菌属费克蓝姆菌属、狡诈球菌属和懒惰菌属均为 PYR 阳性。费克蓝姆菌属和懒惰菌属也为 LAP 阳性、耐盐。圆短链菌属则为 LAP 阴性、耐盐，而狡诈球菌属为 LAP 阴性、不耐盐。狡诈球菌属菌株马尿酸盐水解试验也呈阴性，此试验可与费克蓝姆菌属、圆短链菌属菌株(马尿酸盐水解试验阳性)进一步鉴别。人费克蓝姆菌和懒惰菌属菌株可以脲酶阳性。懒惰菌属菌株存在卫星现象。这些细菌表型特征的进一步细节可参阅参考文献[34-39]及[118]。

6. 创伤球菌属 孔兹创伤球菌的菌落形态(多形成灰色、通常轻微α-溶血的小菌落)，厌氧条

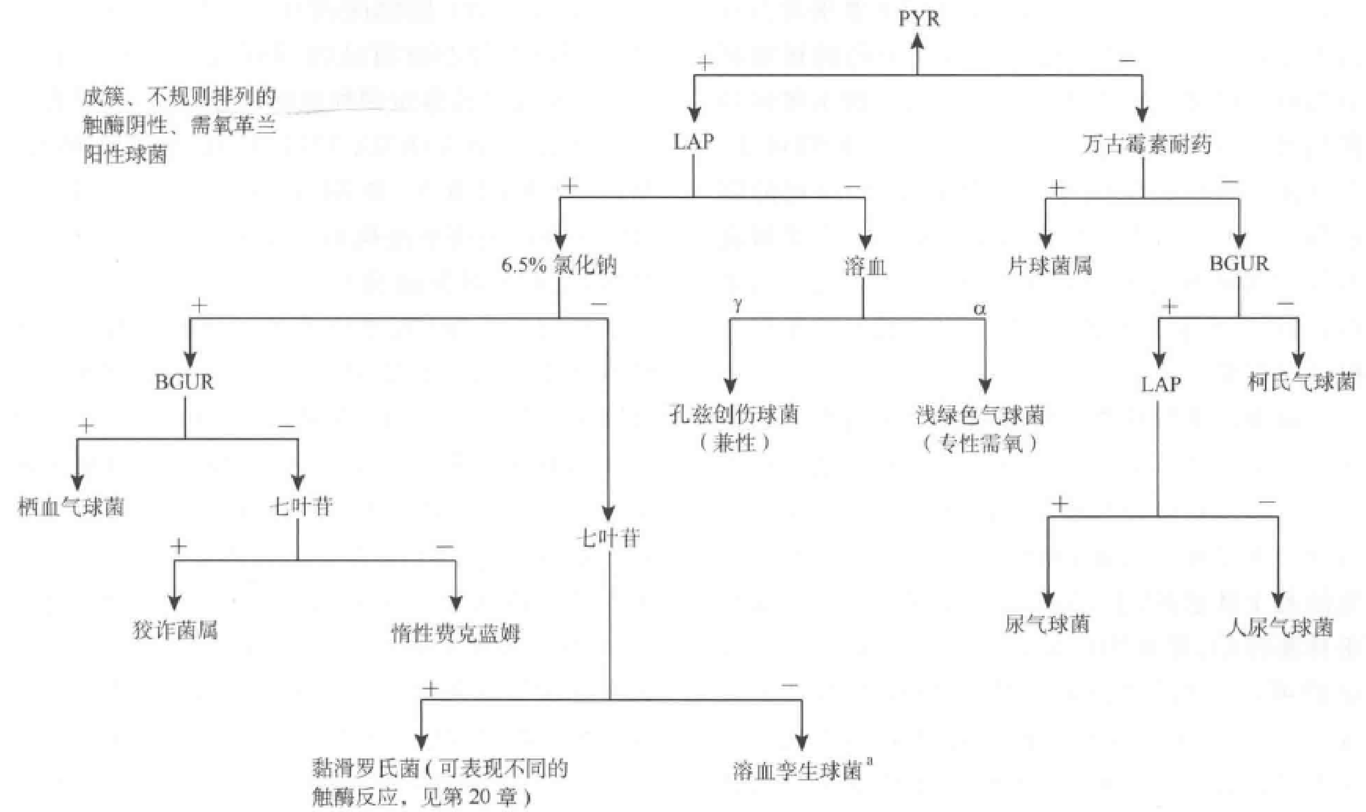


图 25-2　成对、四联、成簇或不规则排列的触酶阴性、需氧革兰阳性球菌的鉴定流程
LAP. 亮氨酸氨肽酶试验；PYR. 吡咯烷酮芳胺酶试验；6.5% NaCl. 6.5% NaCl 生长试验；BUGR. β-葡糖醛酸糖苷酶试验；七叶苷为七叶苷水解试验；[a]2 株新增的孪生球菌属，副溶血孪生球菌和台湾孪生球菌，类似于溶血孪生球菌。详细信息可见参考文献[22]

件下生长良好，培养基中添加 1%马血清或者 0.1%玉米吐温 80 刺激其生长等特征可与需氧球菌（aerococci）鉴别[40]。孔兹创伤球菌分离株 PYR 阳性，API 20 Strep 菌株编号大多是 4100413。从人体分离的其他创伤球菌属菌种（瑞典创伤球菌及提出的“化脓创伤球菌”）PYR 试验为阴性。该属细菌的详细表型数据可参阅参考文献[40-42]。

7. 乳球菌属及漫游球菌属　通常乳球菌属和漫游球菌属 PYR 和 LAP 试验阳性，可在 6.5% NaCl 培养基中生长，易与肠球菌和链球菌混淆。高盐耐受试验方法：将心浸出液肉汤补充 6.0% NaCl（NaCl 终浓度为 6.5%），溴甲酚紫酸碱指示剂可加可不加，试验时应接种 2～3 个菌落，35℃孵育 72 h。当培养基出现浑浊时，无论指示剂是否由紫变黄均表明有细菌生长[6,117]。Facklam 及其同事[6,117]推荐用生长温度试验从肠球菌及链球菌中鉴别乳球菌属。各菌属生长温度特点详见图 25-1。生长温度试验：于肉汤培养基（心浸出液肉汤含 1%葡萄糖及溴甲酚紫指示剂）接种待测菌株的单个菌落或 1 滴肉汤培养菌液，35℃孵育最多到 7 天。推荐使用水浴箱进行 45℃孵育。当培养基出现浑浊时，无论指示剂是否由紫变黄均为阳性。根据 Facklam 和 Elliott 的方法[6]，在改良的动力培养基上穿刺接种，30℃孵育最多到 48 h，漫游球菌属表现为动力阳性，可以与乳球菌属相区别。乳球菌属和漫游球菌属各菌种的详细鉴定试验可参阅参考文献[3][89][106][119]。

8. 明串珠菌、片球菌属及魏斯菌属　PYR 阴性、万古霉素耐药的明串珠菌、片球菌属和魏斯菌属中成员可在血平板上形成 α-溶血或不溶血的小菌落。万古霉素耐药检测可选取几个菌落划线接种于半个含 5%羊血的胰蛋白胨大豆琼脂上，在接种区中央贴一个含 30 μg 万古霉素的药敏纸片，置 35℃富含 CO_2 的环境下孵育过夜。出现任何抑菌圈为万古霉素敏感，而无抑菌圈则为万古霉素耐药[6,117]。除菌体形态不同外（表 25-1），葡萄糖产气试验（gas production from glucose）和精氨酸水

解试验(arginine hydrolysis)也可用于鉴别对万古霉素耐药的菌属,以及对万古霉素耐药的短球状乳酸杆菌菌株。明串珠菌产气且精氨酸水解试验任何时候都阴性。乳酸杆菌这2个试验均可变,但细菌产气且精氨酸水解试验阳性,则可排除明串珠菌属。尽管在临床标本中常见的2个菌种乳酸片球菌和戊糖片球菌的精氨酸水解试验为阳性,但片球菌属其他菌种均不产气、精氨酸水解试验结果可变。

魏斯菌属菌株常会错误地鉴定为明串珠菌或乳酸杆菌。该属分解葡萄糖产气。很少数文献报道其分离株精氨酸水解试验阳性[13]。产气试验是将待测菌接种于MRS肉汤(第20章)中,并以溶化的凡士林密封,于35℃培养,最多至7天。如凡士林塞移动,则证明该菌产气[6,117]。精氨酸水解试验可在含精氨酸的Moeller脱羧酶肉汤中完成[6]。兰氏D群抗原可在片球菌属中检出[117]。明串珠菌属和片球菌属菌种水平鉴定的更多信息可参阅参考文献[6][12][14][114][117]。

(二)上市商品试剂盒及基于表型特征的自动鉴定方法

目前还没有对在本章所述不常见分离菌的上市商品鉴定试剂盒的准确性进行综合评估。同一菌种的各分离株间的表型差异较大,一些细菌相对代谢不活跃,以及数据库只纳入了相对较少的本章细菌,这些都给上市商品试剂盒的准确鉴定带来了挑战。手工方法进行的一些基本鉴定试验(如PYR和LAP)可以利用。提供较全面生化试验组合的上市商品鉴定试剂盒或自动化系统可提高在本章所述细菌的鉴定能力[28,118,120-122]。这些产品包括手工方法试剂盒,如API 20 Strep及RapID Strep;自动化系统,如VITEK 2、MicroScan和Phoenix。即使不能准确鉴定到属或种水平,这些系统也至少可提供补充上述基本试验结果的额外表型信息。

(三)分子生物学技术

1. 测序为基础的技术 与表型检测方法相比,16S rRNA基因测序技术已证明可更准确鉴定不常见的触酶阴性、需氧革兰阳性球菌[120,122]。Bosshard及其同事[120]分析了包括链球菌属、肠球菌属、乏养菌属、气球菌属、颗粒链菌属和孪生球菌属在内的171株临床菌株,发现16S rRNA基因测序技术与上市商品表型检测试剂盒(API20 Strep)相比更易鉴定到种或属水平,并且表型鉴定结果往往与16S rRNA基因测序的结果不相符。Woo及其同事[122]使用了一个上市商品16S rRNA基因测序系统检测乏养菌属、气球菌属、孪生球菌属及创伤球菌属等菌株,该系统分析了527bp的16S rRNA基因片段。研究者认为上市商品表型检测系统及MicroSeq 500与传统的16S rRNA全基因测序的结果不尽相同。研究者强调完整数据库对rRNA基因测序为基础的准确鉴定非常重要。16S rRNA基因的不同区域已用于鉴定。前500 bp序列是鉴定时应用最多的靶点。目前当要对测试菌进行更详细的分类或分型时也可以用16S rRNA全基因测序(1.5 kb)[123]。在本章所述的一些菌属较难使用传统表型方法鉴定,而16S rRNA基因测序技术则是一种有效方法[123-124]。不断累积有临床意义的菌种数据才有可能将菌种的准确鉴定与临床相关信息相联[123]。气球菌属、颗粒链菌属及圆短链菌属鉴定的其他报道也肯定了使用16S rRNA基因测序技术对这些菌属鉴定的优势[44,125-128]。

直接从临床标本中广范围扩增其16S rRNA基因,可检测在本章所述各种培养不生长的菌属(如分离自心脏瓣膜组织的细长颗粒链菌及尿气球菌[129-130])。该法的一个主要挑战是,当同一份标本中存在多种细菌时,很难分析细菌序列数据。Kommedal及其同事使用一套组特异性的广谱16S rRNA基因探针,然后进行DNA测序并用RipSeq分析,从含有其他细菌DNA的脓肿标本中鉴定出孪生球菌属[131]。检测临床标本时,与人类DNA的交叉反应可导致电泳图谱混乱,并使后续的序列分析和菌种鉴定变得复杂。Kommedal及其同事使用双启动寡核苷酸引物技术避开交叉反应,即使标本中有高比率的人类DNA,其效果亦佳[132]。目前又发展了其他测序方法来鉴定在本章所述的细菌。Drancourt及其同事使用PCR法扩增一段740 bp的*rpoB*基因片段后,再进行序列分析,结果证明该分子生物学方法适于链球菌属、肠球菌属、孪生球菌属、乏养菌属及颗粒链菌属的鉴定[133]。Hung等[134]使用*groESL*序列检测3种营养变异链球菌菌种、3种孪生球菌属菌种,并且研发了一种复合PCR技术,可在菌属的

水平上鉴定乏养菌属、颗粒链菌属及孪生球菌属。尽管溶血孪生球菌具有很高的种内异质性，但在很大程度上，菌种内的序列较固定，因此，6株待测的溶血孪生球菌分离株分成了2个亚种。Tung及其同事[135]评价了核糖体16S～23S基因间隔区(ITS)序列分析的可行性，该法可鉴定链球菌属的24个种、乏养菌属的1个种、肠球菌属的18个种和颗粒链菌属的3个种。ITS序列分析鉴定菌种的正确率是98.2%。然而，除链球菌属外的所有菌属都产生了多个PCR产物，因此需要用琼脂糖凝胶分离产物，甚至某些情况下测序前需纯化PCR产物。Tung及其同事[136]进一步研发了一种以ITS区PCR扩增产物为基础的阵列鉴定方法，研究者认为该法是一种有用且可靠的替代表型鉴定的方法。Nielsen及其同事通过获得单一分子平台的方法，鉴定基于ITS分析的非溶血性链球菌、肠球菌及在本章所述细菌[137]。该研究检测的临床菌株包括气球菌属($n=37$)、乏养菌属($n=2$)、颗粒链菌属($n=9$)、孪生球菌属($n=22$)及明串珠菌属($n=5$)。不计已得最大分值，所有75株临床菌株，除2株孪生球菌属外，其他均与预期种属相符。

随着下一代测序技术的迅速应用，基于全基因组序列数据或其提取物的系统开发、鉴定及致病特性对于分类菌群来说将越来越成为可能和可行(第7章)。在本章中所述的所有菌属和菌种的全基因组测序可从网址(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/)找到。

2. 采用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术(MALDI-TOF MS) 用于分析细菌蛋白质的MALDI-TOF MS(第5章)是一项革命性技术，可用于鉴定在本章所述的细菌。在第21章的表21-1和表21-2里，在最近更新的Bruker和bioMérieux体外诊断数据库中列出了许多属和种；仅供研究使用的数据存放在这2个系统。质谱分析法的仪器装置在不断改进，非常罕见和很少见的分类菌群的错误鉴定率也很低和递减的。Christensen及其同事[138]使用Bruker Biotyper系统鉴定了51株培养获得的菌株和90株已知特性的菌株。每个菌株都有24个独立的质谱图谱文库(MSP)储存在各自的菌库中，此菌库可与标准数据库比对(Biotyper version 2.0.43.1)，但标准数据库并不能包含所有待测菌分类信息。目前已有如下菌属入库：气球菌属($n=42$)、孪生球菌属($n=30$)、颗粒链菌属($n=11$)、乏养菌属($n=3$)、乳球菌属($n=9$)、圆短链菌属($n=7$)、明串珠菌属($n=9$)、罗氏菌属($n=9$)、费克蓝姆菌属($n=7$)、漫游球菌属($n=2$)、创伤球菌属($n=4$)、差异球菌属($n=2$)、片球菌属($n=3$)、懒惰菌属($n=1$)，狡诈球菌属($n=1$)和狡诈菌属($n=1$)。虽然工作量较大，但实验室应建立自己独立的MSP，尽可能扩展数据库。数据库扩展后，除少数难鉴定的孪生球菌属菌株外，其他所有难鉴定的菌株都可正确地鉴定到种。平均分值代表了不同菌种内的多样性，也反映了形成MSP时不同条件对平均分值的影响。气球菌属、孪生球菌属、颗粒链菌属及乏养菌属的MSP系统可以准确地将其鉴定到种。因此在常规工作应用中，MALDI-TOF MS显示了其优势。Rychert等报道使用VITEK MS 2.0版系统鉴定了1146株革兰阳性球菌[139]。其中15株为在本章所述细菌：缺陷乏养菌($n=2$)、草绿色乏养菌($n=6$)、溶血孪生球菌($n=3$)、毗邻颗粒链菌($n=1$)、加氏乳球菌($n=1$)、乳明串珠菌($n=1$)及肠膜样明串珠菌($n=1$)。除肠膜样明串珠菌无法鉴定外，其他菌株均能准确鉴定。其他研究也证实MALDI-TOF MS可用于鉴定气球菌属[140]、乳球菌属[141-142]、明串珠菌属[142]，同样也可用此技术鉴定孪生球菌属及片球菌属[143]。

九、分型系统

关于在本章所述不常见革兰阳性球菌属的分型系统知之甚少。分型不常规用于鉴定在本章细菌。

十、血清学试验

在本章所述细菌的血清学试验尚未进行广泛研究，目前临床上尚无有价值的血清学方法。

十一、抗菌药物敏感性试验

在本章所述细菌的抗菌药物敏感性试验一般使用稀释法。纸片扩散法的应用、E-test法与肉汤或琼脂扩散法的相关性研究较少，甚或没有数据。7个菌属(气球菌属、乏养菌属、孪生球菌属、

颗粒链菌属、乳球菌属、明串珠菌属和片球菌属）的标准稀释法及观察MICs解释标准已经在Clinical and Laboratory Standards Institute（CLSI）列出[144]（第76章）。2017年，EUCAST推荐纳入栖血气球菌和尿气球菌[145]。由于缺少标准方法及解释标准，且在本章所述某些菌属分离量相对较少，这导致很难准确评估这些菌属的药物敏感谱。除明串珠菌属、片球菌属及魏斯菌属外，其他所有菌属均对万古霉素敏感。尽管多个菌属对β-内酰胺类抗生素或其他抗菌药物敏感，但因为菌株耐药的多变性，所以每一株分离菌都应检测用于治疗目的抗菌药物的MIC。当某些分离菌需做药敏试验但没有指南存在，可使用稀释法检测MIC而报告中不做评价。在本章所述多种细菌对营养要求较高，操作者常使用含血Mueller-Hinton（M-H）培养基，为使其更好生长，可在CO_2环境孵育进行药敏试验。进行乏养菌属及颗粒链菌属等菌属的药敏试验时，应使用加入盐酸吡哆醛（终浓度为0.001%）的含血培养基[144]。在本章所述每个菌属的已发表的药敏试验研究详见下文。

从人体分离乳乳球菌及加氏乳球菌菌株的体外抗菌药物敏感性试验信息表明，加氏乳球菌菌株对青霉素和头孢菌素的敏感性低于乳乳球菌分离株。Elliott和Facklam[119]报道，加氏乳球菌对克林霉素均耐药，而乳乳球菌对克林霉素均敏感，因此，研究者提议克林霉素的敏感性试验可用于这2个菌种的鉴别。Teixeira及其同事报道漫游球菌属分离株对氨苄西林、头孢噻肟、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑均敏感，所有菌株对克林霉素、洛美沙星和氧氟沙星均耐药。其他抗菌药物敏感性则各有不同[106]。

如果借用肠球菌的MIC标准评价对万古霉素耐药的明串珠菌属和片球菌属，则这2个菌属对青霉素均敏感[144,146]。这2个菌属通常对氯霉素、四环素和氨基糖苷类抗菌药物敏感。已有报道，某些明串珠菌属菌株对碳青霉烯类和头孢菌素耐药[98]。Huang及其同事[147]指出，检测68株明串珠菌属菌株的MIC结果为利奈唑胺0.5～8.0 μg/ml、达托霉素0.06～2.00 μg/ml；13株片球菌属的MIC结果为利奈唑胺1～4 μg/ml和达托霉素0.06～0.50 μg/ml。Iwen及其同事报道，应用达托霉素成功治愈了1例乳酸片球菌心内膜炎患者[148]。

乏养菌属及颗粒链菌属的分离株的药物敏感性数据正在积累。最近几年已经接连报道了39[149]、132[150]、134[151]、和599[152]个分离株的数据。70%～85%的分离株属于毗邻颗粒链菌，20%～30%属于缺陷乏养菌，只有相对较少的分离株属于细长颗粒链菌（最多20个分离株[152]）。研究已表明在敏感性试验模式上有相同的趋势。肉汤微稀释MIC测定及Etest方法已在临床使用。不过，在Alberti等的一项125株乏养菌属和颗粒链菌属的研究中[153]，Etest法显示它们对万古敏感性差，在一定程度上，对青霉素和头孢曲松的敏感性也差。仅10%～14%的缺陷乏养菌和34%～44%的毗邻颗粒链菌菌株报道为对青霉素敏感。有趣的是，细长颗粒链菌菌株对青霉素更敏感，如同Prasidthrathsint和Fisher的研究中[152]80%（16/20）的菌株也是敏感的。在青霉素敏感的毗邻颗粒链菌菌株中，仅65%对头孢曲松敏感，而在青霉素耐药的菌株中，95%的菌株对头孢曲松耐药[152]。Alberti等和Mushtaq等的研究[150-151]中，仅22%～44%的毗邻颗粒链菌对头孢曲松是敏感的。Prasidthrathsint研究组[152]发现大多数青霉素敏感的缺陷乏养菌菌株（95%）对头孢曲松敏感，而97%的青霉素耐药的缺陷乏养菌菌株仍保持对头孢曲松敏感。Alberti等和Mushtaq等研究中的缺陷乏养菌菌株，92%～100%的菌株对头孢曲松是敏感的。已经观察到美罗培南分别对10%的毗邻颗粒链菌和20%的缺陷乏养菌的敏感性降低，且分别对2.4%的菌株和0.6%的菌株的MIC>2 μg/ml[152]。

氨基糖苷类抗生素的敏感性变化也较大，但目前并未见高水平耐药菌株的报道。缺陷乏养菌和颗粒链菌属菌种所致的感染性心内膜炎的治疗方案概述，基于青霉素的MIC数据去分类治疗[154]。抗生素治疗推荐包括青霉素G、头孢曲松或万古霉素，疗程6周，当β-内酰胺类抗菌药使用时，至少在前2周联合氨基糖苷类药物[154-155]。即使给予恰当的治疗，据报道仍有很高的复发率[156]。大环内酯类药物耐药，尤其是对红霉素，已经在数篇研究中报道过，尽管一篇研究发现所有的39株菌全是敏感的[149-150,152,157]。尽管仍有耐药菌株的发生[150,152]，还测定了菌株对利福平和奎奴普丁/达福普汀的敏感性[149]，且大多数菌株对喹诺酮类药物左氧氟沙星和氧氟

沙星敏感[149,152]。达托霉素的 MIC 范围从≤0.125 到>4 μg/ml[150,158]；Alberti 及其同事的研究表明，毗邻颗粒链菌和缺陷乏养菌菌株的 MIC_{90}>4 μg/ml。5 株细长颗粒链菌菌株对 14 种抗菌药 100% 敏感，但红霉素除外，且仅有 1 株敏感。

浅绿色气球菌及溶血孪生球菌显示对青霉素敏感、对氨基糖苷类则呈低水平耐药[159-160]。已证实孪生球菌属分离株对四环素及大环内酯类耐药[161]，而青霉素与庆大霉素有协同作用[160]。Piper 及其同事[158]指出 4 株麻疹孪生球菌对达托霉素的 MIC 值均≤0.125 μg/ml。Buu-Hoi 及其同事[159]提出虽然浅绿色气球菌对大环内酯类、四环素、氯霉素天然敏感，但已经发现这些抗菌药物的耐药菌株。尿气球菌对青霉素、阿莫西林、哌拉西林、头孢吡肟、利福平、呋喃妥因敏感，但对磺胺类和奈替米星耐药[116,162-164]。Humphries 及其同事[165]认为，尿气球菌对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑的耐药性随检测培养基种类而变化。该菌株在含低胸腺嘧啶核苷的马血培养基上培养时对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑敏感[165]。栖血气球菌分离株对青霉素、阿莫西林、头孢噻肟、头孢呋辛、红霉素、氯霉素、奎奴普丁/达福普汀、利福平、利奈唑胺、四环素敏感[28]。

LaClaire 和 Facklam[24] 研究表明，懒惰狡诈球菌临床分离株对青霉素、阿莫西林、头孢噻肟、头孢呋辛、克林霉素、左氧氟沙星、美罗培南、奎奴普丁/达福普汀、利福平及四环素均敏感。据报道对红霉素敏感性的差异较大，27 株中的 1 株对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑耐药。

创伤球菌属感染已经可用阿莫西林克拉维酸钾、氟喹诺酮类、第三代头孢菌素治疗，但缺乏关于这些病原体对抗菌药物敏感性的全面数据[88]。最近，Guérin 及同事[166]报道了在孔兹创伤球菌感染中，一个新的染色体编码的 *erm*[47] 决定簇是造成结构性大环内酯-林可霉素-链阳菌素 B 耐药的原因。费克蓝姆菌属菌株对多种抗生素的 MIC 值差异较大[167]。有研究报道，27 株血圆短链菌对阿莫西林均敏感，但对其他抗菌药物耐药水平差异较大[168]。

十二、结果的评价、解释和报告

在本章所述革兰阳性球菌仅当确定其有临床意义(如多次分离到、培养出纯菌落或分离自无菌部位)时才需要治疗，因为这些菌属也可能是污染菌或机体正常菌群。与临床医生沟通可帮助微生物实验室评估这些不常分离细菌的意义。表 25-1、图 25-1 和图 25-2 中提及的表型试验可帮助鉴定不常分离的触酶阴性、革兰阳性球菌。上市商品鉴定系统的附加表型试验、分子生物学方法都有助于在本章细菌鉴定。目前仅有针对在本章所述的 7 个菌属的药物敏感性试验指南。当有意义的分离菌需做药敏试验但没有指南存在，可使用稀释法检测 MIC 而在报告中不做评价。

众所周知，乏养菌属、颗粒链菌属及孪生球菌属是导致心内膜炎的致病菌。乏养菌属及颗粒链菌属有卫星现象及这 3 个菌属 PYR 阳性反应，有助于从草绿色链球菌中鉴别这些菌属。对于乏养菌属和颗粒链菌属，药敏试验及结果解释应遵守 CLSI 指南[144]。对万古霉素耐药的明串珠菌属、片球菌属及魏斯菌属是临床不常见的分离株，但已证实是菌血症、中枢神经系统感染、免疫缺陷患者中的感染的致病菌。万古霉素耐药的表型试验(见本章鉴定部分)对于鉴定这些菌属有重要意义，并可指导临床抗菌药物治疗。药敏试验和结果解释指南适用于明串珠菌属和片球菌属[144]。气球菌属中的尿气球菌属是导致尿路感染的病原菌，在尿培养中分离出大量优势菌时应报告。在本章提及的表型鉴定试验可推测性鉴定尿气球菌，已证实该菌对 β-内酰胺类抗生素和呋喃妥因敏感[116,162-163]。

参考文献请扫二维码查阅

第4篇

革兰阳性杆菌

第26章 需氧革兰阳性杆菌鉴定的基本方法

KATHRYN A. BERNARD

（李佩珊 译；吕火烊、刘文恩 审校）

本章主要描述需氧革兰阳性杆菌和一些兼性厌氧菌的鉴定规则，以便于读者在需要获取更多信息时易于找到相应章节。应强调的是，富营养培养基上24～48 h生长菌落的形态和革兰染色信息是鉴别需氧革兰阳性杆菌的起始且重要的特征。除非速生分枝杆菌外，其余所有需氧革兰阳性杆菌株均可在血平板上生长，其具体生长要求会在其他章节中描述。

"规则"的杆状形态的革兰阳性菌其细胞通常在纵向上具有两条非弯曲的平行长边。如未能在初始培养时观察到芽胞形成现象，可在乏营养培养基上进行测试。"不规则"的杆菌是指两条长边弯曲且不平行的细菌细胞。在富含CO_2环境下孵育有利于观察β-溶血。菌落具有黄色或橘色色素者通常是不规则杆菌，某些具有部分抗酸性的菌属[如戈登菌属(*Gordonia*)和红球菌属(*Rhodococcus*)]也可能具有黄-橘色色素(第30章)。具有营养基丝(vegetative substrate filaments)的杆菌可有分枝菌丝，这些菌丝或可形成芽胞，或可通过分裂繁殖。营养基丝在初始时(如48 h内)可能不存在，易导致错误鉴定结果。生化活性差和(或)代表性不足或缺失的细菌可能需要使用分子生物学方法鉴定，在商品化的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)系统数据库中，可进行属和种的最终鉴定，包括严格厌氧革兰阳性杆菌的菌属也可能含有耐氧或需氧生长相对良好的种或菌株，这一点特别是在放线菌属(*Actinomyces*)、放线棒菌属(*Actinobaculum*)、*Actinotignum*(译者注：无中文译名)、丙酸杆菌属(*Propionibacterium*/*Cutibacterium*)某些种的部分细菌(第54章)和第三梭菌(*Clostridium tertium*)(可产生大量气体)等可以见到，并可见于耐氧的梭菌属的某些种(第55章)。由于在琼脂平板(不是肉汤)培养生长细菌的革兰染色表现，部分需氧革兰阳性球菌，如明串珠菌属(*Leuconostoc*)的某些种(第25章)及变异链球菌(*Streptococcus mutans*)(第23章)等可能在一开始就误认为革兰阳性杆菌。某些革兰阳性杆菌[如红球菌属某些种(第30章)或皮杆菌属(*Dermabacter*)(第29章)]由于初始革兰染色表现，可误认为革兰阳性球菌。表26-1交互引用了不同革兰阳性杆菌种属的相关性状。在对病原体进行初步检查后，微生物学工作者应参考表26-1中列出的本手册中的相关章节。

作为常规表型分类或化学分类试验的补充手段，本章中所涉及的病原体定性或进一步分类的分子方法在本手册的每一节中均有简要描述，并在第7、11和17章进行了概述。应用16S rRNA基因序列分析和其他(二代)靶基因序列分析鉴定分离株已在许多微生物学实验室成为常规方法，因为罕见的病原体可能在商业数据库中缺乏代表性，常规的生化方法不能明确鉴别，而越来越多地通过MALDI-TOF MS系统鉴别，这些方法对于病原体的最终鉴定至关重要。然而，对其结果的解读必须由对当今系统分类学方法具有良好认知的专业人员进行(第18章)。当2个或多个已公认的分类群组间的基因序列一致性很高时，16S rRNA基因序列分析不能作为唯一的分类方法。这一点特别在其序列一致性大于98.7%[1]或99%[2]，同一种内成员判定标准时更应注意。在这种情况下，建议做二代或另外的其他基因序列分析[2]。

由于MALDI-TOF MS技术一直认为可以快速、经济、准确地鉴别常见和罕见的病原体，该技术目前广泛用于临床微生物学(第5章)。这一技术在特定分类种群中的应用和局限性在每一章节中均有概述。下文会提供一些关于MALDI-TOF MS应用的综述[3-5]。

表 26-1 革兰阳性杆菌鉴定的基本方法[a]

细胞形态	色素	营养基丝	芽胞形成	过氧化氢酶	代谢	不常见革兰染色特点	抗酸染色	部分或弱抗酸性	气生营养菌丝	运动	属(章)	评论
规则	—	—	+	V	O 或 F	常为较大细胞	—	—	—	V	芽胞杆菌属,类芽胞杆菌属,解硫胺素芽胞杆菌属(*Aneurinibacillus*)、枝芽胞杆菌属(*Virgibacilius*),有时存在于芽胞杆菌科其他属中(第 27 章)	炭疽芽胞杆菌,参见第 15 章
	—	—	—	+	F	—	—	—	—	+	李斯特菌属(*Listeria*)(第 28 章)	在 20～25℃运动活跃
	—	—	—	—	F	—	—	—	—	—	丹毒丝菌属(*Erysipelothrix*)(第 28 章)	TSI 产 H_2S
	—	—	—	—	F	—	—	—	—	—	乳杆菌属(*Lactobacillus*)(第 54 章)	部分菌株触酶弱 +
不规则	—,亦可呈黄或黑灰色	—	—	+	O 或 F	马球球杆形;罕见以下形态如鞭形、凸起	—	—	—	—	棒杆菌属(*Corynebacterium*)(第 29 章)	
	—	—	—	+	O	细长杆状	—	—	—	—	苏黎世菌属(*Turicella*)(第 29 章)	
	—	—	—	+	F	球形	—	—	—	—	皮肤杆菌属(*Dermabacter*)(第 29 章)	
				+	F	短杆状	—	—	—	—	创伤杆菌属(*Helcobacillus*)(第 29 章)	
	—,或黄色	—	—	+	O	短杆状	—	—	—	—	短杆菌属(*Brevibacterium*)(第 29 章)	
	—,或黑灰色	—	—	V	F	呈多形性	—	—	—	—	罗氏菌属(*Rothia*)(第 22 章和 29 章)	
	—	—	—	—	O	球杆状或杆状	—	—	—	V	节杆菌属(*Arthrobacter*)和以前称为节杆菌属的细菌(第 29 章),耳炎杆菌属(*Auritidibacter*)(第 29 章)	形态可在球-杆状间变换
	—	—	—	—	F	革兰染色不定,球杆状	—	—	—	—	加德纳菌属(*Gardnerella*)(第 29 章)	在V琼脂上有 β 溶血
	—	—	—	—或 V	F	放线菌属某些种有分支	—	—	—	—	隐秘杆菌属(*Arcanobacterium*)和储珀菌属(*Trueperella*)(第 29 章),放线菌属(*Actionomyces*、*Actinotignum*)和放线棒菌属 *Actinobaculum*,动弯杆菌属(*Mobiluncus*),丙酸杆菌属(*Propionibacterium*/*Cutibacterium*),*Varibaculum*(译者注:无中文译名)(第 54 章)	口腔放线菌(*Actinomyradicidentis*),呈球杆形
	—	—	—	—	F	多形性,"双歧杆菌样"	—	—	—	—	双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)和以前称为双歧杆菌属的细菌[b](见第 54 章)	
	黄色或黄橘色	—	—	—	F	弱革兰阳性杆状	—	—	—	V	纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)(第 29 章)	
		+		+							厄氏菌属(*Oerskovia*)(第 29 章)	
					F					V	纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*)(第 29 章)	

（续　表）

细胞形态	色素	营养基丝	芽胞形成	过氧化氢酶	代谢	不常见革兰染色特点	抗酸染色	部分或弱抗酸性	气生营养菌丝	运动	属(章)	评论
不规则	黄色或黄橘色	−	−	+	O		−	−	−	V	短小杆菌属(*Curtobacterium*)(第 29 章)	
	黄色或黄橘色	−	−	+	O 或 F		−	−	−	V	微杆菌属(*Microbacterium*)(第 29 章)	微杆菌属某些种触酶 −
					O					+	雷弗森菌属(*Leifsonia*)(第 29 章)	
	黄色或黄橘色	−	−	+	F		−	−	−	V	纤维单胞菌属	
										V	微小杆菌属(Exiguobacterium)(第 29 章)	
	−	+	−	+	O		+	−	−	−	分枝杆菌属(*Mycobacterium*)(第 31～34 章)	
	−	+	−	+	O		+	−	−	−	慢反应脂肪酸菌属(*Segniliparus*)(第 30 章)	麦康凯琼脂不生长
	−	+	−	+	O		−	+	+	−	诺卡菌属(*Nocardia*)(第 30 章)	
	−,黄色,粉色	+或 V	−	+	O		−	+或−	−	−	冢村菌属(*Tsukamurella*)戈登菌属(*Gordonia*),红球菌属(*Rhodococcus*),迪茨菌属,威廉姆斯菌属(*Williamsia*)(第 30 章)	迪茨菌属(*Dietzia*)通常,没有抗酸性
	−	+	−	+	O	圆形细胞致密聚集	−	−	−	+	嗜皮菌属(*Dermatophilus*)(第 30 章)	β-溶血
	−,黄色	+	−	+	O		−	−	+	−	马杜拉放线菌属(*Actinomadura*),链霉菌属(*Streptomyces*),拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*),诺卡土壤菌属(*Nocardiopsis*),偶见于假诺卡菌科(*Psendonocardiaceae*)其他属中(第 30 章)	某些株没有气生菌丝
	−	+	−	+	O		−	−	+	−	糖单胞菌属(*Saccharomonspora*),糖多胞菌属(*Saccharopolyspora*),耐热放线菌属(*Thermoactinomyces*)(第 30 章)	可在 50℃生长

注：[a]+. 所有或几乎所有菌株为阳性；−. 所有或几乎所有菌株为阴性；V. 可变；O. 氧化代谢；F. 发酵代谢；TSI. 三糖铁斜面；产色素，即菌落产生色素，否则，菌落呈灰白或白色；典型的色素包括黄色或淡黄色(Y)以及橘黄色(Y-O)，黑灰色(B-G)偶可见到，某些红球菌属和威廉姆斯菌属某些种可呈粉色珊瑚虫样。本表不包括第 29 章中介绍的如壤霉菌属(*Agromyces*)、小短杆菌属(*Brachybacterium*)、诺尔菌属(*Knoellia*)和两面神菌属(*Janibacter*)。[b] 异斯卡多维菌属(*Alloscardovia*)的菌株特别耐氧

自本手册最新版发布以来，细菌基因组全基因组测序（第17章）的应用迅速发展。本手册细菌学章节中概述的许多临床相关革兰阳性菌的分类群的草图或封闭基因组，现已存入NCBI的公共数据库中，或在同行评审的出版物中进行了概述。近年来，进行全基因组测序的成本显著下降，因此在不久的将来，将菌株的鉴定、分型、耐药基因检测和毒力因子的测定相结合，可能成为一种有吸引力的分类方法[6]。

参考文献请扫二维码查阅

第27章　芽胞杆菌属和其他需氧芽胞杆菌*

CHRISTINE Y. TURENNE, DAVID C. ALEXANDER

（李佩珊　译；吕火烊、刘文恩　审校）

一、分类学

历史上，大多数需氧芽胞杆菌被分类为芽胞杆菌属（*Bacillus*）细菌。然而，随着系统分类学在原核生物分类系统方面的应用，其分类发生了改变。需氧芽胞杆菌的最低分类学标准[1]承认遗传学特征在分类学上的作用，同时也强调了详细的表型特征的重要性。对于任何新的分类单元，关于其分类学特征的描述建议最少应基于5株、理想状态下应基于10株或更多菌株的综合特性。然而，需氧芽胞杆菌中新种和某些菌属仅以单一一个分离株为代表，缺乏更多样本，限制了对其属内或种内变异的评估。根据这一项建议，芽胞杆菌属名称仅保留给枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis*）和蜡样芽胞杆菌（*Bacillus cereus*）2个进化支系[2]，许多的芽胞杆菌属被重新命名并分配到新的单系和表型相关的分类单元。

目前，已知需氧芽胞杆菌有100多个菌属和7个芽胞杆菌目[杆菌纲（Bacilli），硬壁菌门（Firmicutes）]。需氧芽胞杆菌的分类变化或增加新种对于临床微生物学家而言意义有限，因其绝大多数为非致病性环境微生物。医学上重要且可经常见到的相关菌属包括芽胞杆菌属、类芽胞杆菌属（*Paenibacillus*）、短芽胞杆菌属（*Brevibacillus*）和赖氨酸芽胞杆菌属（*Lysinibacillus*），分别有大于300、大于200、23和25个物种（http://www.bacterio.net/），这些菌均归属于芽胞杆菌科（Bacillaceae）和类芽胞杆菌科（Paenibacillaceae）2个最大的科中。其中，只有一小部分在临床标本中被检测到。除了极少数例外，环脂酸芽胞杆菌科（*Alicyclobacillaceae*）、巴氏芽孢菌科（*Pasteuriaceae*）、动性球菌科（*Planococcaceae*）和芽胞乳杆菌科（*Sporolactobacillaceae*）等尚不清楚是否包含与临床相关的细菌种。与芽胞杆菌目（Bacillales）其他细菌不同，高温放线菌科（*Thermoactinomycetaceae*）细菌呈丝状，可产生基内菌丝、气生菌丝和内生芽胞。虽然其中某些菌是真正的需氧芽胞杆菌，基于本手册编写目的，笔者将高温放线菌科与需氧放线菌（actinomycetes）归在一起（第30章）。

蜡样芽胞杆菌群也被称为蜡样芽胞杆菌，包含了临床上大多数相关的物种。广义的蜡样芽胞杆菌包括蜡样芽胞杆菌（狭义）、炭疽芽胞杆菌（*B. anthracis*）和苏云金芽胞杆菌（*B. thuringiensis*），以及耐寒的维森芽胞杆菌（*B. weihenstephanensis*）和 *B. wiedmannii*（译者注：无中文译名）、耐热的产细胞毒素芽胞杆菌（*B. cytotoxicus*）、形态各异的蕈状芽胞杆菌（*B. mycoides*）和假蕈状芽胞杆菌（*B. pseudomycoides*）、属于益生菌的东洋芽胞杆菌（*B. toyonensis*），还有越来越多见的环境相关条件致病菌"*B. gaemokensis*"、"*B. manliponensis*"、"*B. bingmayongensis*"（译者注：无中文译名）和9种海洋沉积物与海水的新物种[3]。由于关键的表型特征是由毒力质粒获得或丢失决定的，最明显的是毒素的产生和结晶的形成，这与传统的系统分类物种命名不一致[5]。大型全基因组测序数据库的有效性，引发了对蜡样芽胞杆菌群的重

---

*本章包括 Niall A. Logan、Alex R. Hoffmaster、Sean V. Shadomy 及 Kendra E. Stauffer 在本手册第10版24章和 James W. Snyder 在本手册第11版第26章中所呈现的部分内容

新分类[4]。炭疽芽胞杆菌一般是特定的致病性克隆，而蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌是多样性的。假蕈状芽胞杆菌、产细胞毒素芽胞杆菌和东洋芽胞杆菌包含有不同支系，而维森芽胞杆菌最近被提出为蕈状芽胞杆菌的支系[6]。

二、菌属描述

芽胞杆菌属是芽胞杆菌科的典型属，且包含最多种类。典型的芽胞杆菌属分离株呈杆状，可形成芽胞，需氧或兼性厌氧生长，触酶阳性，有周生鞭毛，可运动。显微镜下观察，呈单个、成对、短链或长链排列。新鲜培养物革兰染色常呈阳性，但陈旧培养物则易呈革兰不定或阴性着色。然而，该属细菌表型多样，某些种可不产生芽胞，或可表型为兼性或严格厌氧、嗜热或嗜低温等特征。触酶试验阳性可区分芽胞杆菌和少数需氧的梭菌属。菌落形态在种间和种内会有显著差异，这也可能取决于培养介质和条件。在临床微生物学实验室，大多数分离株在常规的培养基上生长良好，例如，血平板和巧克力平板上的菌落，培养过夜后变得很大。

其他临床上重要的需氧芽胞杆菌属是指表型与芽胞杆菌属相似，但确有某些区别存在的微生物。土壤芽胞杆菌属（*Geobacillus*）严格嗜热生长，嗜热脂肪土壤芽胞杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*）通常用作实验室质量控制活动的生物学指标（如高压灭菌效果和消毒剂杀芽胞活性的监测等）。赖氨酸芽胞杆菌属细菌细菌壁糖肽富含赖氨酸和精氨酸，借此可予鉴别。类芽胞杆菌属和短芽胞杆菌属培养物可被染成革兰阳性，但其更可能呈革兰阴性或不定，其胞子囊常呈肿胀样。此外，某些需氧芽胞杆菌，分离自极端或奇异的环境中，它们呈广泛多样的表型特征，可能会在临床实验室中遇到，通常被认为是污染菌，而在实验室环境中并找不到。

三、流行病学和传播途径

需氧芽胞杆菌在自然界中普遍存在，可在包括自酸性到碱性、无盐到高盐，以及热到冷等各种条件下的土壤和水环境中发现。由于芽胞可抵抗热、干燥、辐射、消毒剂等的作用，这类细菌可在大多数其他微生物不能生存的环境下长期存活，这些不寻常的极端环境包括高空气体、地下水、冰川冰核、冻土、温泉及火山灰等。芽胞随风、灰尘、气溶胶等播散并污染如医院手术室、工业洁净室等人类环境。由于其与食物腐败和食物中毒有关，这些微生物是食品生产、加工环境中所不希望存在的污染物。然而，这类细菌在某些传统发酵食品、益生动物饲料和植物助长剂（horticultural supplements）的生产中是必需的。同样，在临床上遇到的某些种（如枯草芽胞杆菌、巨大芽胞杆菌和地衣芽胞杆菌）则被用于某些酶类（淀粉酶、蛋白酶、纤维蛋白酶等）、抗生素（如多黏菌素、黏菌素和短杆菌肽等）和杀虫剂（如苏云金杆菌毒素）等的商业生产。同时，被认为是昆虫和其他无脊椎动物病原体的球形赖氨酸芽胞杆菌（*Lysinibacillus sphaericus*）和侧胞短芽胞杆菌（*Brevibacillus laterosporus*），可用于生物防治。类芽胞杆菌属中的固氮微生物，与植物根相关，当用作生物肥料时可以促进作物生长[7]。

绝大多数的需氧芽胞杆菌是非致病性腐生菌。虽然经常可在微生物室见到，其中包括蜡样芽胞杆菌群、巨大芽胞杆菌（*B. megaterium*）、枯草芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌（*B. licheniformis*）、短芽胞杆菌（*B. pumilus*）及简单芽胞杆菌（*B. simplex*），但只有小部分分离株具有临床相关性，且大部分被认为是人类条件致病菌。通过摄食、注射、创伤、吸入或接触被芽胞或菌细胞污染的物体等可造成传播。

从人类胃肠道可培养的需氧放线菌的特征表明，有大量的芽胞杆菌和相关微生物，其中克劳斯芽胞杆菌（*Bcacillus clausii*）、地衣芽胞杆菌、短芽胞杆菌最常被分离出来。其他 7 种芽胞杆菌属（包括 3 个新的分类群）和赖氨酸芽胞杆菌属（*Lysinibacillus*）、大洋芽胞杆菌属（*Oceanobacillus*）、鸟氨酸芽胞杆菌属（*Ornithinibacillus*）、尿素芽胞杆菌属（*Ureibacillus*）、枝芽胞杆菌属（*Virgibacillus*）也被分离出。因此，需氧芽胞杆菌也被认为是共生的肠道细菌[8]。

虽然一些环境物种被认为是昆虫的病原体，但只有炭疽芽胞杆菌被认为是严格的动物病原体。野生和家养动物通过食入被芽胞污染的土壤、水或者植物，而最常见的是炭疽芽胞杆菌。动

物间的直接传播是通过食入感染炭疽的动物尸体，而这种情况比较少见。叮咬的苍蝇被认为是导致炭疽流行地区大规模暴发的媒介，而不叮咬人类的苍蝇可能是炭疽感染动物的尸体或者植物的媒介[9]。炭疽芽胞杆菌的芽胞可存活多年，极其不易被根除。有权威机构认为，在某些土壤中炭疽芽胞杆菌可自身维持存活[10]，而土壤中阿米巴可支持炭疽芽胞杆菌芽胞的发芽和繁殖[11]。人类感染病例主要是由于直接接触感染动物（非工业）或动物制品（工业）所致，例如羊绒、动物皮毛或动物骨头。兽药疫苗的使用、工业卫生的改善、加强对进口动物产品的要求，以及在发生疫情（包括禽畜和野生动物）时实施适当的控制措施有助于显著降低发病率。然而，炭疽仍然是许多国家的地方病，尤其是缺乏有效疫苗接种政策的国家，人类和动物感染病例经常有报道[如世界卫生网站报道的：每年有100例的炭疽感染病例（http：www. promedmail. org/）]。

部分缺乏粮食或长期食品不安全的地区，可能引发感染，而最常见的情况是，在屠宰场等收监管的场所之外屠宰和（或）处理了被炭疽感染的动物[12]。常规疫苗接种可以预防炭疽热，但通常只有在发现病例后才进行牲畜疫苗接种。在病例确诊方面的延误可能会影响控制措施，延长疫情，并影响被感染动物的销售和屠宰。由于这些挑战，炭疽仍然很常见，特别是在中美洲和南美洲的农业区、撒哈拉以南非洲地区、中亚和南亚及南欧和东欧。动物中的散发病例在其他地区可见，包括美国和加拿大的中部地区。

挪威、丹麦、法国、德国和英国有病例涉及被（炭疽）污染的海洛因。据推测，与欧洲病例相关的海洛因可能从源头运输的过程中被炭疽的芽胞污染（例如，从感染炭疽的动物皮肤中污染），但是，可能由于在运输的路线上缺乏充分的地理采样，仍然难以确定个别的毒株的真正来源[13]。

炭疽热不是传染病。人与人之间传播已有报道，但很罕见[9]。标准预防措施对于任何形式的炭疽热患者是足够的，除非存在大量破损皮肤的分泌物，在这种情况下，建议采取接触预防措施（http：//www. cdc. gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/isolation-guidelines. pdf）。

由实验室事故、生物战和生物恐怖事件引起的炭疽病例也很少见，但临床微生物学实验室的保持警惕是至关重要的（第15章）。

四、临床意义

芽胞杆菌属、短芽胞杆菌属、赖氨酸芽胞杆菌属和类芽胞杆菌属有重要的临床意义，大多数的需氧芽胞杆菌不具有或极少具有潜在致病性，因此，很少将它们与疾病相联系。然而，其中重要的例外是包括炭疽芽胞杆菌在内的蜡样芽胞杆菌群细菌。由于炭疽在医学和历史上的重要意义，蜡样芽胞杆菌和炭疽芽胞杆菌将在后文分别描述。

（一）需氧芽胞杆菌（除外蜡样芽胞杆菌群）

芽胞杆菌属（除外蜡样芽胞杆菌属）、短芽胞杆菌属、赖氨酸芽胞杆菌属和类芽胞杆菌属通常认为是条件致病菌。患者通常是由于伤口、手术部位或医疗设备被芽胞污染而引起感染，而典型的患者是免疫功能低下或同时患有基础疾病（如癌症或肾病）。由芽胞杆菌引起的大量临床病例早有报道。然而，在较早的研究中鉴定方法并不总能确定到种，因此，曾用名可能与当前的分类方法不一致。也就是说，过去常见的物种至今仍常见。通过测序和（或）基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）分析鉴定菌种，临床微生物学实验室中最常见的分离菌种有蜡样芽胞杆菌群（除外炭疽芽胞杆菌）、巨大芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌、短芽胞杆菌、单纯芽胞杆菌[14-15]。少见临床分离株有类芽胞杆菌属，主要有灿烂类芽胞杆菌（*Paenibacillus lautus*）、解葡聚糖类芽胞杆菌（*P. glucanolyticus*）、解淀粉类芽胞杆菌（*P. amylolyticus*）、软化类芽胞杆菌（*P. macerans*）和菲尼基类芽胞杆菌（*P. phoenicis*）[14-16]，少数临床少见但确实存在的分离株有短芽胞杆菌属和赖氨酸芽胞杆菌属。

枯草芽胞杆菌是芽胞杆菌属的模式种。由于分类学的变化，一些先前鉴定为枯草芽胞杆菌的临床分离株重新划归于其他种属，也有真正枯草芽胞杆菌感染病例发生[17]。较早前的研究（早期分子分析和早期质谱分析）虽然很难证实分离株是枯草芽胞杆菌，但已有报道白血病或肿瘤患者的肺炎、菌血症和脓毒症等，也有报道自手术伤口

引流部位、乳房假体和房室分流术、滥用药物引起的心内膜炎和头部外伤引起的脑膜炎等分离到枯草芽胞杆菌。枯草芽胞杆菌也被认为是食源性疾病的病原体，有在食物中分离到较大数量（10^5～10^9 CFU/g）枯草芽胞杆菌记录[17]。虽然有几种芽胞杆菌属、类芽胞杆菌属和短芽胞杆菌属被用作益生菌，但只有1例败血症被报道，这是由于免疫缺陷患者长期使用益生菌所致[17]。

地衣芽胞杆菌是另一种与临床疾病相关的需氧芽胞杆菌。其偶然出现毒力至少可部分归因于地衣素（lichenysin）的产生，该毒素是一种热稳定性的细胞毒性环脂肽[17]。地衣芽胞杆菌感染病例与手术并发症和被污染的医疗器械有关[18]。短小芽胞杆菌已知能够产生对热稳定的细胞毒环脂肽，称为短小酸苷（pumilacidins）[19]。短小芽胞杆菌与炭疽样皮肤感染[20]、免疫抑制患者的细菌感染[21]、中心静脉导管感染和免疫力强儿童感染性关节炎[22-23]、新生儿败血症[24]有关。巨大芽胞杆菌偶可自血液、伤口分泌物和尿标本中分离[25]。由巨大芽胞杆菌引起的皮肤损伤类似于皮肤炭疽，就表型而言，巨大芽胞杆菌与炭疽芽胞杆菌有相似之处[25-26]。环状芽胞杆菌（*B. circulans*）可自癌症伴血液感染病例、脑脊液分流术感染病例，以及脑膜炎、心内膜炎、伤口感染等病例分离[27]。然而，需要注意的是，由于分类学的变化，其部分分离株现在可能被划归为类芽胞杆菌属。这几种芽胞杆菌包括枯草芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌及短小芽胞杆菌已从食品分离出，并被认为是食源性疾病的病原体[17]。

类芽胞杆菌属广泛存在于环境中，并用于农业活动，包括生物防治和促进生长。大多数的类芽胞杆菌引起的感染与穿透性损伤和被污染的医疗设备有关。同样，任何环境株都有可能污染伤口或样本，而发现新物种并不罕见[16]。球形赖氨酸芽胞杆菌与致命的肺假性肿瘤、菌血症和脑膜炎等有关[28]。

由于环境中存在大量的需氧芽胞杆菌，因此，很难从污染物和菌群中分离出有临床意义的菌株。尽管如此，各类芽胞杆菌属、类芽胞杆菌属和短芽胞杆菌属都分离自临床标本，且为意义不明确的单一分离株[29]，如分离自脑脊液的普罗旺斯类芽胞杆菌（*P. provencensis*）和分离自尿的尿类芽胞杆菌（*P. urinails*）。数个短芽胞杆菌属也自临床标本分离获得，这包括从支气管肺泡灌洗液中发现的中胞短芽胞杆菌（*B. centrosporus*）和自乳腺脓肿中发现的类短短芽胞杆菌（*B. parabrevis*），上述2种菌都已从人类血液标本中分离获得[30]。

由需氧芽胞杆菌属引起的眼部感染可能是非常严重的，通常发生在穿透性眼外伤的情况下。芽胞杆菌属是引起暴发性（外源性）眼内炎的重要原因，常导致预后不良。枯草芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌和其他芽胞杆菌是眼内炎常见病原体，而最常见的是蜡样芽胞杆菌[31-32]。蜂房类芽胞杆菌、侧胞短芽胞杆菌和赖氨酸芽胞杆菌属感染病例也有报道，但罕见。芽胞杆菌属包括巨大芽胞杆菌可引起角膜接触镜相关的角膜炎。有报道认为，奥罗黎芽胞杆菌（*B. oleroninus*）是慢性眼睑炎的共致病病原体，该菌是在蠕形螨肠道中分离发现[33]。

多种需氧芽胞杆菌混合感染也曾有过报道。这些通常与注射吸毒或自残行为有关[34-36]。

（二）炭疽芽胞杆菌

Robert Koch 在炭疽方面里程碑式的工作帮助建立了疾病的微生物感染理论。炭疽主要是野生动物和家畜罹患的疾病，该病在历史上曾是牛、绵羊、山羊和马等动物的首要致死原因。

根据感染途径的不同，人类炭疽病的主要临床类型分为皮肤炭疽、胃肠道炭疽、吸入性炭疽和注射性炭疽，估计病死率分别为1%、25%～60%、46%和33%[37]。成年男性病例占炭疽病例的绝大多数，但儿童患者的病情更为严重[38]。其最初的症状没有特异性且较轻微（如疲劳、不适、发热、胃肠道症状等），但当病原菌自原发损伤部位经淋巴造血系统播散后，病情暴发性迅速进展。临床症状可包括呼吸困难、发绀、高热、定向障碍，继之出现循环衰竭、休克、昏迷，直至死亡。细菌可在宿主血液中迅速增殖，在患者生命的最后数小时，菌量在终末水平在不同宿主可达10^7～10^9 CFU/ml。提高临床和实验室的专业能力是快速诊断炭疽的关键。鉴于炭疽芽胞杆菌具有的潜在生物危害性，建立前瞻性监测和应对准备很有必要。同样，病例调查应着力确定感染源，以便鉴别疾病是自然发生还是恶意所为。

皮肤炭疽在自然发生的人类炭疽病中约占99%。全球发病率不易确定，根据各国的防控策略和卫生系统的实力差异，国家间炭疽发病率的

变化很大,发病率最高的地区是在非洲和中亚、南亚地区[9]。美国的炭疽发病率极低,在过去 30 余年间,除去 2001 年的生物恐怖主义事件,其年度病例报告 0～2 例[39]。虽然病例报道和动物研究提示预先存在的皮肤破损并非感染所必需,但典型的感染常发生在芽胞接种破损的皮肤后。昆虫叮咬引发的感染罕见[40]。通常在经过 1～6 天的潜伏期(其潜伏期范围为数小时到 3 周)后,皮肤出现一个小的丘疹。再经 24 h 发展成环状水疱,最后溃烂形成黑焦痂,这是皮肤炭疽的特征。焦痂一旦形成会逐渐变厚,其周围弥漫水肿。通常情况下,局部不会出现发热、化脓、疼痛的症状,一旦有此类症状出现,则可能是继发其他细菌感染的指征。在抗菌治疗出现之前,10%～20%未经治疗的皮肤炭疽是致死性的,现在,不足 1%的病例可能致死。其致命原因主要是面部或颈部损伤所伴随的水肿阻塞了气道所致,当然,也可能在皮肤炭疽进展为系统性感染时发生。焦痂需数天进行演变,但是即便是使用最有效的抗菌治疗,也需要几周才能消散。

胃肠道炭疽因食用感染动物所致,特别是当食入生肉或未充分煮熟的肉类时。可有无症状病例发生,且并不少见。胃肠道炭疽通常有两种表现形式[41],口或口咽型的特点是在口腔、舌、扁桃体、咽喉壁形成损伤。其症状包括恶心、呕吐、厌食、腹痛、发热、轻度腹泻(可发展为血性腹泻)、呕血及大量腹水等。由于肠炭疽没有特异的早期症状,针对性的抗菌治疗可能因此延误,导致病死率变化较大[41]。

吸入性炭疽是少见但严重的炭疽病类型。在整个 20 世纪,美国仅记录有 21 例自然获得的吸入性炭疽[42]。随着时间的推移,病死率有所改善,可能是由于诊断能力提高和早期的适当治疗。从前,该疾病称为肺炭疽,但其首选名称"吸入性炭疽"则能更准确地反映该病活跃的感染发生在淋巴结而不是肺本身的事实。令人遗憾的是,炭疽芽胞杆菌已被开发和部署用于生物战争和生物恐怖主义。最近一次已知事件发生在 2001 年底,经信件邮寄炭疽芽胞杆菌的芽胞进行的恶意播散在美国导致暴发 22 例炭疽,其中 11 例经实验室确诊为吸入性炭疽,包括所有 5 例在暴发中死亡的病例[43]。分析表明,该病的中位潜伏期为 4 天(范围为 4～6 天)。临床表现包括发热或寒战、疲劳或不适、轻微咳嗽或干咳、呼吸困难及恶心或呕吐等。部分患者会有胸痛和出汗。所有患者胸片均不正常,或有胸腔积液和浸润,或表现为纵隔增宽[44]等。

注射型炭疽是指与毒品注射相关的病例。虽然该病的传染途径也是通过皮肤,但其症状不同于皮肤炭疽。注射点周围的皮肤可能出现淤青或褪色,但特征性的丘疹和焦痂缺如。患者通常表现为伴有明显水肿的严重软组织感染,并可迅速进展为感染性休克。小部分病例可能出现蜂窝织炎症状,只需使用抗生素,但大多数病例需手术干预,如清创或筋膜切开术[45]。

在过去的十年中,已发生了数例与建筑、装卸和制作兽皮鼓被炭疽芽胞污染相关的皮肤、吸入性和胃肠道炭疽病例[42,46-47]。1979 年,苏联乌拉尔市的叶卡捷琳堡(前称斯维尔德洛夫斯克)出现了一次大规模暴发,罪魁祸首被认为是一个军事生产设施基地意外泄漏炭疽芽胞[48]。在已发生的病例中,找不到感染源的情况极少。2011 年,1 位男士在美国 4 个州旅行时感染了吸入性炭疽,这 4 个州包括炭疽作为地方性兽病的美国中西部州。虽然有专门的调查通过专业炭疽研究团队周密而详尽的抽样检查,却始终没有找到确定的暴露源[49]。

(三)蜡样芽胞杆菌群

蜡样芽胞杆菌广泛分布于自然界中,能够在很多生态环境中分离得到。临床上,蜡样芽胞杆菌群是条件致病菌,其引起的局部(如眼、皮肤、伤口)和系统(如菌血症、脓毒症、脑膜炎、心内膜炎、呼吸道及泌尿道)感染均有报道[50]。全身性感染最常见于免疫功能低下(如血液系统恶性肿瘤)的患者。蜡样芽胞杆菌的芽胞对多种消毒剂都有抗性,手术后或院内获得性感染通常可追踪到蜡样芽胞杆菌污染的手套、工作服、床单、敷料、医疗器械(如导管、分流器、植入物、支气管和呼吸机等),甚至可追踪到污染的消毒用酒精棉[51-53]。继发于创伤,包括切割伤、擦伤、手术和烧伤的蜡样芽胞杆菌感染,是由于原发创伤被来自土壤、水,以及其他环境的细菌芽胞污染所致[54-55]。针对蜡样芽胞杆菌污染药品事件,无论是遵守相关规定意外发生的污染,还是非法行为导致的污染,均有报道[56-57]。眼损伤和医疗操作(如白内障手术和玻

璃体腔内注射)均能导致蜡样芽胞杆菌眼内炎。除非快速治疗干预,上述严重情况都有可能导致视力下降。蜡样角膜炎虽不常见,但常与戴角膜接触镜相关[50]。

蜡样芽胞杆菌是最常与食源性疾病相关。根据食源性疾病暴发在线数据库工具(FOOD TOOL;https://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks/),1998—2016年,在美国疾病控制与预防中心(CDC)报告的19 986例食源性疾病暴发中,645例(约3.2%)分离出蜡样芽胞杆菌。致死是极其罕见的,不到1%的病例需住院治疗。欧洲食品安全局的监测数据显示,有力证据表明413例蜡样芽胞杆菌暴发与可疑的食品运输车有关,2007—2014年,6657例人类感染病例被报道,352例(约5.3%)住院治疗,没有死亡病例[58]。然而,这些统计数据可能低估了蜡样芽胞杆菌疾病的真实数量,因为这些细菌在食源性疾病的临床、流行病学及实验室调查中常被忽视。由于它们在通常的烹调温度下和许多清洁过程中能够存活,蜡样芽胞杆菌广泛存在于在食物制备和生产环境中。典型的食物中毒继发于食物不恰当保存过程中细菌芽胞发芽和产毒的细菌增殖之后。蜡样芽胞杆菌群细菌可导致2种不同类型的食物中毒综合征:呕吐型以恶心、呕吐为特征,通常在食入被污染食物0.5～6.0 h或之后出现症状;腹泻型以腹痛、腹泻为特征,其症状出现要晚一些,一般在食入被污染食物8～16 h或后发病[17,59]。蜡样芽胞杆菌可从各种食物中分离出,但是米饭常与呕吐型暴发相关,尤其是亚洲风味的炒饭,而肉类、淀粉类食物和蔬菜更常与腹泻型相关[17,59]。

(四)蜡样芽胞杆菌群的毒素和其他毒力因子

蜡样芽胞杆菌(包括炭疽芽胞杆菌)菌株的致病性归因于其产生的多种外毒素、肠毒素、溶血素和溶细胞素等。现在研究的目标是要确定各种毒素的相应功效,包括其分布、结构、作用机制及导致蜡样芽胞杆菌疾病的特殊作用等[59-62]。这些毒素的表达受包括营养状况、氧浓度(例如氧化还原电势)、pH和细胞密度等的多种环境因素的控制。

与炭疽芽胞杆菌毒力相关的2种毒素分别为致死毒素和水肿毒素。2种毒素菌由2部分组成:保护性抗原(protective antigen,PA)和一个酶解因子(enzymatic factor. EF),包括致死毒素酶解因子(lethal factor,LF)和水肿毒素酶解因子(edema factor,EF)。PA促进毒素到达靶细胞,LF和EF则在此阻断细胞信号传导通路。编码PA、LF和EF的*pagC*、*lef*和*cya* 3个基因位于pXO1毒力质粒上。而蜡样芽胞杆菌荚膜的聚-γ-D-谷氨酸合成所需基因(*capB*、*capC*、*capD*和*capE*)位于pXO2毒力质粒上。低毒力炭疽芽胞杆菌表现为pXO1和(或)pXO2的丢失[63-64]。相反,从严重和致命的肺炎和炭疽样皮肤病变的人类病例中分离出蜡样芽胞杆菌致病性菌株中发现了pXO1样质粒和荚膜的生物合成能力[61,65]。蜡样芽胞杆菌炭疽生物型的发现是从对野生动物和家畜动物炭疽样疾病的调研开始。到目前为止,还没有从人类中分离出这些菌株,蜡样芽胞杆菌群在系统发育上与炭疽芽胞杆菌不同,但都具有pXO1和pXO2毒力质粒[66-67]。

多种毒素与蜡样芽胞杆菌食物中毒症状有关。食入热稳定性毒素cereulide(蜡样内酯),可引发呕吐型食物中毒的特征性症状,即呕吐。cereulide毒素由质粒携带的*ces*基因簇编码产生,并仅可在狭义蜡样芽胞杆菌亚群和苏云金芽胞杆菌菌株中检出[59,62]。腹泻型蜡样芽胞杆菌食物中毒同样也是由包括非溶血性肠毒素(nonhemolytic enterotoxin,Nhe)、溶血素BL(hemolysin BL,HBL)和细胞毒素K(CytK,也称为溶血素Ⅳ)等的多种毒素引起[59]。编码Nhe的基因位于染色体上,存在于大多数蜡样芽胞杆菌群分离株中[59,62]。HBL毒素虽然分布广泛,但在产细胞毒素芽胞杆菌中并不存在。CytK首次分离自一株产肠毒素的菌株,该菌现已被作为产细胞毒素芽胞杆菌的典型菌株[68],尽管它不产毒素cereulide和HBL,但是它导致了一次3人死亡的食物中毒暴发事件。2007—2014年,在法国74例与蜡样芽胞杆菌相关的食源性疾病中,有7例分离出产细胞毒素芽胞杆菌菌株[59]。CytK毒素分为2种,包括产细胞毒素芽胞杆菌产生的CytK-1,且毒性更强,而CytK-2在蜡样芽胞杆菌群中最为流行。

传统上,人们根据苏云金芽胞杆菌产生的杀昆虫蛋白组成的伴胞晶体定义不同的菌株。基于测序的研究表明,晶体蛋白(*cry*)基因存在于广义蜡样芽胞杆菌不同分支的多个系统中[5]。BT毒

素广泛用于农业害虫控制，但这些应用不会对人类健康构成威胁。

五、样本的采集、运输和储存

(一)除炭疽芽胞杆菌外的其他芽胞杆菌菌种

用于没有疑似炭疽样疾病的病例中分离的临床样本，可以按照标准方法进行处理[69-70]。按照标本采集程序操作，常规的细菌培养可使菌株复苏[71]，本书第19章对此进行了描述。理想情况下，标本在室温下，使用无菌螺旋盖容器或拭子2 h内运送至实验室。芽胞杆菌属是罕见的侵袭性疾病病原体，因此，通常无菌的样本，如脑脊液、其他液体和组织应尽快(室温下15 min内)运送至实验室，以便苛刻菌的培养。如果运输延误(大于2 h)，诸如粪便、痰等严重污染部位的标本应保存在2～8℃下运送。由于芽胞杆菌是常见污染菌，2个及多点的血液采集，对于评价临床相关性显得尤其重要。疑似眼内炎的病例，玻璃体抽吸物和活检组织是最佳样本，其处理过程越快越好，最理想的是在床边接种平板和涂片，并立即送往实验室。

自临床标本分离除炭疽芽胞杆菌外的芽胞杆菌属细菌(或称蜡样芽胞杆菌炭疽生物型)，在标准预防措施下可以在开放实验台进行操作。应尽量避免产生气溶胶的操作，任何可能产生气溶胶的过程均应在生物安全柜中进行。涉及临床样本和诊断量感染性培养物的所有操作建议在2级生物安全实验室(BSL-2)的围护装备和设施中进行操作。详见本书第13章。

迄今，具有临床意义的分离株是那些在37℃条件下可在常规培养基上生长，并且通常可形成芽胞的菌株。但是，将血琼脂上的原代或传代培养物保存在培养基或培养箱中，芽胞将会自动产生的认识是错误的。最好的方法是让其在营养琼脂或含5 mg/L硫酸锰的胰酶大豆琼脂培养基培养数天，当显微镜观察到大多数细胞已经形成芽胞时放入冰箱保存。这些斜面培养形成芽胞的培养物密封后存置于冰箱保存，细菌可存活数年，亦可将培养物(最好已形成芽胞)冷冻或冻干保存。

(二)炭疽芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌炭疽生物型(*B. cereus bv. anthracis*)

在很多国家，炭疽芽胞杆菌的保存受立法法律管理。美国卫生与公众服务部及其CDC和美国农业部及其动植物检验检疫局(APHIS)将炭疽芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌炭疽生物型列为一级A类生物因子(http://www.selectagents.gov/selectagentsandtoxinslist.html)。加拿大《人类病原体与毒素法案》(http://lois-law.justice.gc.ca/eng/acts/H-5.67/FullText.html)将炭疽芽胞杆菌和炭疽毒素分别列为3级和1级生物因子进行管理。关于人类感染剂量尚未确定，但现在使用的数据主要是基于非人类的灵长类的研究。据美国国防部估计，炭疽芽胞杆菌对人类的半数致死剂量为8000～10 000个炭疽芽胞杆菌芽胞。除了患者标本外，所有确诊的炭疽病例还应寻找潜在感染源的标本(如动物毛皮、毛发和尸体等)，但并未对环境或非临床标本进行地毯式处理。WHO关于《人类和动物炭疽病指南》的附录1和3中，有关于个人防护装备及消毒和去污染的完整细节描述。需要注意，使用含乙醇无水擦剂对于清除芽胞无效。采用肥皂和水或者氯己定洗手，以及用含有次氯酸盐的毛巾擦手，能减少皮肤上的芽胞污染。

(三)与生物恐怖有关的样本及实验室反应网络

1999年，美国卫生与公众服务部及其下属的CDC与公共卫生实验室协会及美国联邦调查局合作建立了实验室反应网络(Laboratory Response Network，LRN)，以整合协调实验室对公众健康紧急事件及生物恐怖事件的应对工作。LRN将地方实验室(前哨实验室)与具有专业检测能力和增强的生物安全防护能力的州实验室(参考实验室)和联邦(国家实验室)联结在一起。在所有50个州均有能够快速检测和鉴定包括炭疽芽胞杆菌在内的各种生物因子的参考实验室。同时，LRN还可对可疑或危险的样本的检测和运输提供指导。哨点实验室指南和州及地方公共卫生实验室的联系信息，可通过CDC网站(http://emergency.cdc.gov/lrn)和美国微生物学会网站(http://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guide-

lines)获得。对于一般性的问题，设有 24 h 热线电话[(800)CDC-INFO/(800)232-4636]和 7 天内电子邮件(www. cdc. gov/info)在线提交。有关 LRN 和生物威胁制剂的更多信息可以查阅第 15 章。

(四)疑似炭疽患者的样本

CDC 发布了对疑似炭疽患者的临床评估指南(http://www. cdc. gov/anthrax/specificgroups/lab-professionals/recommended-specimen. html)。表 27-1 总结了关于样本的运输和储存条件。由于炭疽芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌炭疽生物型的危害性，在与国家或省级卫生部门协商并获得批准后，哨点实验室应将与炭疽症状一致的患者标本转运到参考实验室进行检测。关于可能含有炭疽芽胞杆菌样本的采集和运送的其他信息在《LRN 哨点临床实验室方案》(http: www. asm. org/index. php/guidelines/sentinel)、加拿大《危险货物运输管理条例》(http://www. tc. gc. ca/eng/tdg/safety-menu. htm)及《临床微生物学流程手册》中均有描述[72]。在美国，运输炭疽芽胞杆菌需要填写 APHIS/CDC 的表 2(运输特定生物因子和毒素的要求，http://www. selectagents. gov/form2. html)，并需要预先获得 CDC 或 APHIS 的核准(见 http://www. selectagents. gov/，以获取美国关于特定生物因子和毒素管理条例的相关信息)。非注册的临床实验室和哨点实验室邮寄和运输感染性物质，必须遵循当前的包装和运输指南(http: www. asm. org/images/PSAB/PackAndShip. pdf)[73]。应使用防渗漏的包装盒，然后将其装入第二层包装盒中，形成双层包装，而后密封于外包装盒中进行运送。

炭疽类型的诊断取决于其临床表现[9]，而培养仍然是诊断炭疽的金标准。无论何时，只要有可能，应在开始抗菌治疗之前采集患者样本。如不可能，将组织置于 10%福尔马林缓存液中固定，并使用特殊染色或免疫组织化学(IHC)进行病理学检测以确认。在所有炭疽的临床症状中，急性期血浆(首选)或血清样本可检测 LF 毒素。由于在抗菌治疗过程中，毒素水平逐渐下降，应在出现症状 7 天内(最多 18 天)或已知暴露后尽快采集样本检测 LF 毒素。尸体样本也有诊断价值。有关样本采集和尸体样本的提交，请参考上述 CDC 链接。

1. 皮肤炭疽 如疑为皮肤炭疽，用拭子采集 2 分样本，一个拭子用于革兰染色和培养，另一个用于核酸扩增试验(NAAT)。取样的方法取决于病变的阶段。在发病早期(利于检测)，采集未破溃的水疱液。在焦痂(后期)阶段，需将焦痂边缘提起，用棉拭子在其下旋转采集 2 份水疱液样本。如只看到溃疡，应在病变的基底部采样。病变的全层活检样本(包括邻近皮肤)可用于组织病理学、特殊染色和免疫组化检测。如患者未使用抗生素治疗或已接受治疗 24 h 内，应提交第二次活检进行培养和 NAAT 检测。如出现水疱和焦痂，应同时采集活检组织[74]。如果患者出现全身感染的症状，建议进行血培养检查。

2. 吸入性炭疽 吸入性炭疽仅在患者有可疑流行病学史时才予考虑，建议行胸部 X 线片和 CT 扫描检查。应采集血液进行培养。对于因先期治疗导致血培养失败的病例，血清学检查有助于诊断。应采集急性胃血清(发病 7 天内)和恢复期血清(14～35 天)进行血清学试验。理想情况下，康复期应在急性期采样 2 周后再采样检测。炭疽的所有类型都可以进行血清学试验。在有胸腔积液的情况下，应采集相应标本进行革兰染色、培养和 NAAT 检测，以及 LF 毒素检测。对于胸膜和(或)支气管活检标本；也可进行特殊染色和免疫组化的病理学检查。

3. 胃肠道炭疽 胃肠道炭疽也是只有在患者有相应的病史资料时才会考虑。可按照皮肤炭疽标本的采集方式采集口腔病损标本，并将其用于革兰染色、培养和 NAAT 检查。应采集血液标本用于培养，而用于血清学分析应采集急性期和恢复期的血清样本。应采集粪便、直肠拭子及腹水(如果有)样本用于革兰染色、培养和 NAAT 检查。腹水也适用于 LF 毒素的检测。

4. 注射型炭疽 组织活检物或组织样本可在病灶清创时或手术中采集。应采集血液并按需进行血清学和 LF 毒素检测。

5. 炭疽性脑膜炎 炭疽性脑膜炎可以单独发生，但更为常见的是继发于其他形式的炭疽病之后。如疑有任何形式的炭疽，且患者还出现严重头痛、精神状态改变、癫痫、脑膜征或局灶征，应采集脑脊液样本进行革兰染色、培养和 NAAT 检查。应采集血液标本，进行血培养、血清学和 LF 毒素检测。

表 27-1 根据临床类型，诊断炭疽的标本采集和检测建议

样本类型[a]	说明	试验	运送和保存	皮肤型	吸入型	胃肠道型	注射型	脑膜型
病灶拭子	2 只拭子，分别培养和 NAAT 检测	培养，NAAT 检测	培养和(或)NAAT：2～8℃；只 NAAT：干冰保存	水疱，焦痂，溃疡	NA	口咽，直肠	NA	NA
活检组织	取活检组织；如果已使用抗生素治疗，建议病理检查	培养，NAAT 核酸检测；组织病理学检查，染色，免疫组化(IHC)	培养和(或) NAAT：新鲜，干冰保存；10%福尔马林缓冲液：室温保存	水疱，焦痂(如有都需要)	支气管、胸膜活检	NA	清创损伤组织	NA
血清	急性期(7 天内)，或急性恢复期(14～35 天)	LF 毒素或血清学检查	参考 CDC 指南[b]	是	是	是	是	是
血浆	急性期 0～18 天(最好提前)；10 ml EDTA；冰浴 30 min，然后离心	LF 毒素(较血清好)	干冰保存	是	是	是	是	是
全血	按医院实验室操作规程操作；PCR 检测，10 ml，EDTA 或柠檬酸钠	培养，PCR	冰袋保存	如有全身感染迹象	是	是	是	是
脑脊液	>1 ml，无菌容器	培养，PCR	冰袋保存	是	是	是	是	是
其他体液	>1ml，无菌容器	培养，PCR；LF 毒素	冰袋保存	NA	胸腔积液	腹水	NA	NA
尸体	参考 CDC 建议(链接见正文)	组织病理学检查，染色，免疫组化(IHC)	石蜡包埋(优先)；10%福尔马林：室温保存	是	是	是	是	是

注：[a] https://www.cdc.gov/anthax/specificgroups/lab-professionals/cdcspecimens.html；[b] https://www.cdc.gov/anthax/specificgroups/lab-professionals/recommended-specimen.html

(五)疑似患有炭疽动物的样本

当食草动物发生突然或始料不及的意外死亡,特别是当伴有鼻腔、口腔或肛门出血时,或者死亡发生在历史上曾有炭疽发生的地点时(即便是在几十年前),应将炭疽作为可能的死亡原因予以考虑。样本采集可受患病动物种类和死亡时间的影响[9]。因炭疽死亡的动物,在完整动物尸体内的炭疽芽胞杆菌由于腐败而迅速死亡。但是,在很多组织中仍然会有芽胞形成,所以,一般情况下,动物尸体标本可给出阳性培养结果。对于死亡1~2天的新鲜尸体,包括外周血液和组织活检标本(如从耳尖上剪取的组织)均为合适的样本。炭疽芽胞杆菌可经革兰、吉姆萨或多色亚甲蓝(M'Fadyean)染色后直接观察,用于镜检时血性渗出液优于血液或组织样本。由于炭疽芽胞杆菌与腐败菌相比竞争力弱,自陈旧尸体(死亡2~3天)采集的样本涂片可能不易检见该菌。替代的办法是,采集组织或血液污染的其他样本进行培养检查。如果动物被解剖,应采集脾和淋巴结样本。对于腐烂或非常陈旧的尸体,用棉拭子采集鼻孔、鼻甲和眼窝样本,但是最好的样本可能是自动物头、尾下方采集的泥土。

六、直接检查法

有临床意义的需氧革兰阳性杆菌包括棒杆菌属、李斯特菌属、乳杆菌属和诺卡菌属等属中的不同种,其中芽胞杆菌易于通过表型和显微镜形态区别。芽胞杆菌革兰染色通常表现为大的、两端平整的阳性杆菌,排列有时呈单个或成对,也可形成长链状。由于炭疽芽胞杆菌芽胞革兰染色不明显(图27-1a~b),因此,不易与其他芽胞杆菌属区别开来(图27-1c~f)。多次血培养阳性,或患者死亡及患者死亡前血培养检出病原体是应高度怀疑芽胞杆菌(包括炭疽芽胞杆菌)引起的严重感染。需氧芽胞杆菌可能呈染色不定或革兰阳性,也可能呈革兰阴性(图27-1d)。其他需氧芽胞杆菌,如类芽胞杆菌属、短芽胞杆菌属或球形赖氨酸芽胞杆菌涂片薄或更薄时容易出现革兰阴性(图27-1e~f)。

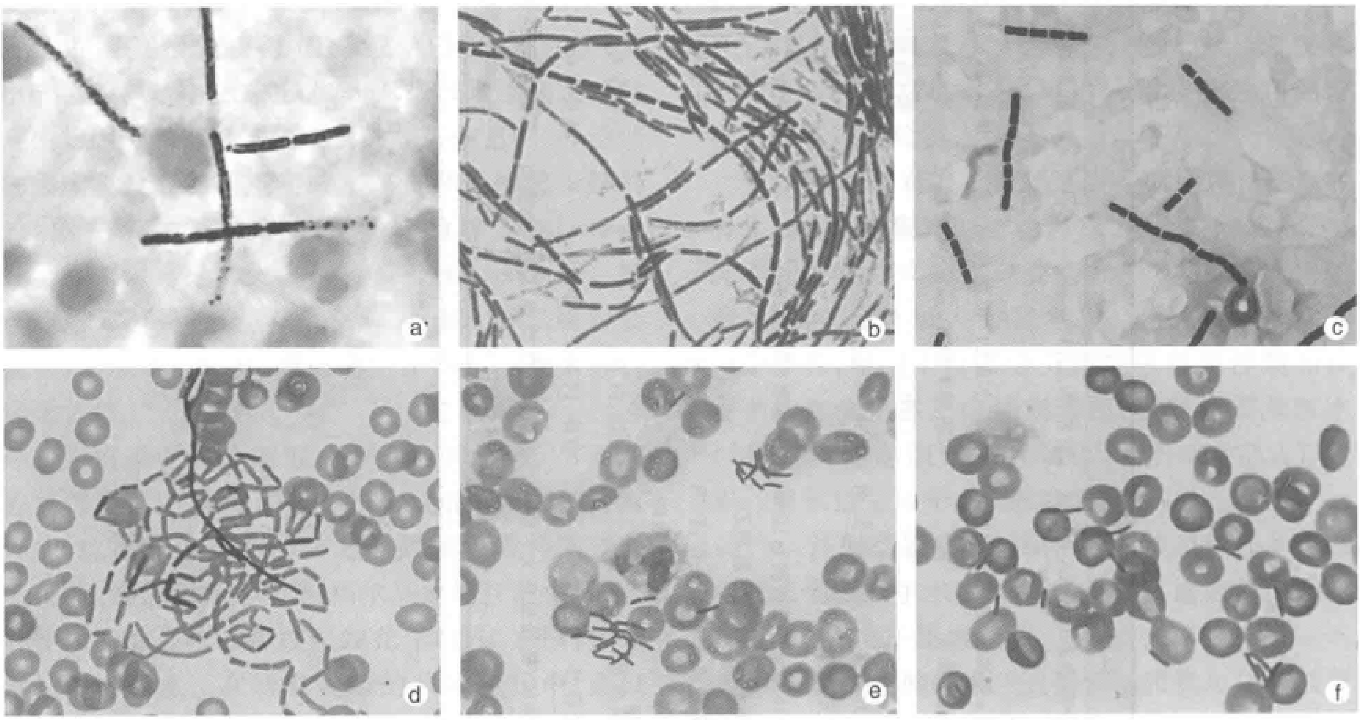


图27-1 需氧芽胞杆菌的显微镜下图片,革兰染色,用亮视野显微镜观察,c~f为血培养阳性分离株

注:a. 与生物恐怖袭击有关的炭疽芽胞杆菌革兰染色结果,图示入院患者的外周血白细胞层中的革兰阳性杆菌;标尺,3 μm(图片由H. Masur提供);b. 从血琼脂涂片呈长链状;c. 蜡样芽胞杆菌;d. 巨大芽胞杆菌,革兰染色阴阳不定;e. 解脲芽胞杆菌;f. 污染短芽胞杆菌(*Brevibacillus invocatus*),见彩插

多色亚甲蓝(M'Fadyean)染色可使炭疽芽胞杆菌的特征结构——荚膜清晰可见(图 27-2a)。血液涂片直接显微镜检查,可以看到围有荚膜的杆状细菌,如果血液样本采集于治疗之后,则可见到荚膜"鬼影"。必须注意的是,LRN 临床哨点实验室指南不推荐在哨点实验室进行炭疽芽胞杆菌的荚膜形态观察,其染色只能在参考实验室进行。失去 pXO2 质粒可产生无荚膜炭疽芽胞杆菌,其常会被错认为蜡样芽胞杆菌[64]。同样,其他非炭疽芽胞杆菌细菌偶尔也会获得荚膜生物合成基因,荚膜染色法及 NAAT 等也会将其与炭疽芽胞杆菌混淆(见下文)。

当细胞中存在有未着色区域时则可能是芽胞存在的指征(图 27-2b)。虽然不方便,但革兰染色涂片可用丙酮-乙醇除去镜油,经洗涤后再行芽胞染色检查。Schaeffer-Fulton 芽胞染色法[75]是将经热固定的涂片用 10%孔雀绿水溶液浸染 45 min(不需加热),洗涤后用 0.5%番红复染 30 s。1000 倍放大时可在显微镜下见到粉红色的细菌,有芽胞存在时则可见其被染为绿色(图 27-2c)。1000 倍放大时,相差显微镜能够将芽胞和其他内容物如聚羟基丁酸酯颗粒(PHB)区分开来。芽胞更大、更亮,其形状、大小和位置较内容物颗粒更有规律。芽胞囊的形态对于种水平的鉴定具有价值。

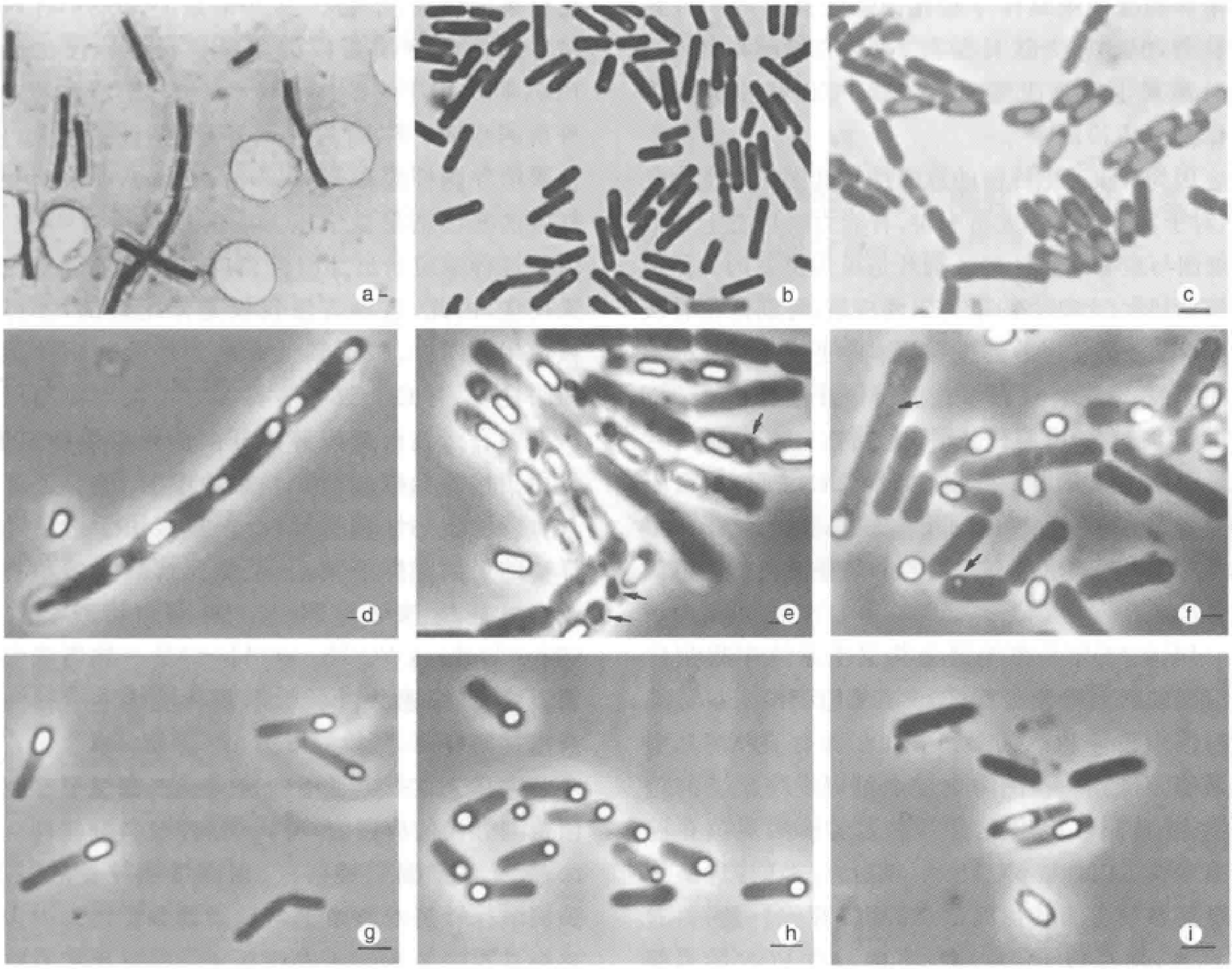


图 27-2 芽胞杆菌的光学显微镜照片(a~c)和相差显微镜照片(d~i),标尺:2μm

注:a. 炭疽芽胞杆菌,M'Fadyean 染色,可见豚鼠血液涂片上的荚膜杆菌;b. 赖氨酸芽胞杆菌属,革兰染色可见末端芽胞;c. 蜡样芽胞杆菌芽胞囊芽胞染色,绿色是芽胞,红色是繁殖体细胞;标尺:2μm(图片由 M. Rodriguez-Diaz 提供);d. 蜡样芽胞杆菌,可见宽大的繁殖体细胞及椭圆形近端生芽胞,芽胞囊无膨胀;e. 苏云金芽胞杆菌,可见宽大的繁殖体细胞及椭圆形近端生芽胞,芽胞囊无膨胀,并可见杀虫毒素的伴胞晶体(箭头所示);f. 巨大芽胞杆菌,可见宽大的繁殖体细胞及椭圆形、圆形近端生或端生芽胞,芽胞囊无膨胀,并可见 PHB 内含物(箭头所示);g. 环状芽胞杆菌,椭圆形近端端生芽胞,芽胞囊膨胀;h. 球形赖氨酸芽胞杆菌,球形端生芽胞,芽胞囊膨胀;i. 多黏类芽胞杆菌,椭圆形中央旁或近端生芽胞,芽胞囊轻度膨胀,见彩插

现有的基于分子和抗原的样本直接检查方法中，大部分被开发用于蜡样芽胞杆菌和炭疽芽胞的检测试验。蜡样芽胞杆菌食物中毒相关的症状与其毒素有关，人们对于引起腹泻型蜡样芽胞杆菌食物中毒的肠毒素复合体的特性认识也越来越明晰[59]。有3种商业试剂盒可用于检测食物和粪便中的肠毒素Nhe和（或）HBL，包括反向被动乳胶凝集试验Oxoid BCET-RPLA试剂盒，基于酶联免疫吸附试验的3M Tecra腹泻芽胞杆菌肠毒素视觉免疫测定法试剂盒和侧流免疫层析法Duopath Cereus Enterotoxins试剂盒。应用各细胞系和细菌培养的生物试验已被开发用于食物提取物和培养物滤液中蜡样芽胞杆菌呕吐毒素的非特异性检测，但这些方法日益被NAAT检测取代[76]。针对毒素生物合成基因的实时PCR试验也可用于毒素分析检测[59]。

因为炭疽芽胞杆菌的致病性和其潜在的生物危害，对于实验室工作人员来讲，有能力将形态上相似的细菌与炭疽芽胞杆菌区别开是极为重要的。任何时候见到大、无动力的革兰阳性杆菌，特别是在有炭疽样综合征症状一致的患者标本中见到大量这样形态的细菌，应该怀疑其可能为炭疽芽胞杆菌。LRN提供了排除炭疽芽胞杆菌和送检潜在分离株的方案。已证明，应用炭疽芽胞杆菌特异性LRN PCR试验[77]和血清学试验[78]等在内的几种方法，在确诊2001年暴发的生物恐怖事件和近期与制鼓业有关的炭疽病例中是有效的[47,74]。

LRN PCR是在美国公共卫生系统中得到广泛应用的有效检测方法[77]。该法检测位于炭疽芽胞杆菌染色体和pXO1和pXO2毒力质粒的几个不同基因位点。检测多个位点可以提高试验的特异性，并且能够检出无毒力或无荚膜的炭疽芽胞杆菌菌株（如缺少pXO1和pXO2），否则，这些细菌可能被误认为其他细菌（如蜡样芽胞杆菌）。对于CDC，患者的任何临床标本的阳性PCR结果都被认为是支持或推定诊断的依据，这包括正常情况下无菌部位的标本（如血液和CSF）或者其他病损组织标本（如皮肤、肺、网状内皮或胃肠道组织标本）。这样的结果足以支持可能的诊断，但其本身不是确定诊断。对于NAAT应用和其结果在确定诊断中的价值制定如此严格的指南的主要原因是存在非炭疽相关病损的环境污染造成假阳性结果的可能性。这一情况在应用针对之前发表的某些荚膜基因和染色体基因的PCR引物更是如此，这些引物可与土壤微生物产生假阳性反应。这与2008年WHO指南中的建议十分相似[9]，该指南建议将PCR用于分离株的鉴定，但不能用于样本的检测。最近以NAAT为基础试剂盒快速检测炭疽芽胞杆菌引起的菌血症已开发使用。这种方法需采集末梢血，检测限为10 CFU/ml，对于自炭疽患者分离株和样本的非炭疽芽胞杆菌检测特异性为100%[79]。这种类型的分析方法适用于生物恐怖袭击现场检测。

多种免疫测定法可用于临床炭疽芽胞杆菌感染的检测。RedLine Alert是一个可在15 min内出结果的快速检测法，其基础是应用一个针对炭疽芽胞杆菌S层蛋白的特异性抗体。该法已经FDA批准用于绵羊血平板生长的、无溶血的芽胞杆菌的检测。厂商的数据显示，用该方法对145株炭疽芽胞杆菌和45株非溶血性的、非炭疽芽胞杆菌的测试结果提示该方法的敏感性为98.6%。由于这种鉴定炭疽芽胞杆菌的方法可能会发生交叉反应，因此，这种方法仅仅是推定性的，不可单独使用。同样，根据其他标准如怀疑炭疽芽胞杆菌阴性，也有必要进一步检测。由美国海军医学研究中心开发的炭疽芽胞杆菌的免疫层析试验，可用于检测血液和组织渗出液中的PA。该方法具有高度敏感性和特异性，一直被用于检测动物样本的炭疽芽胞杆菌，甚至是死亡数天的动物标本也可应用该法检测[80]。炭疽生物威胁警报（The Anthrax BioThreat Alert）是一种侧流免疫层析法，可快速从可疑粉末和环境样本中检测出炭疽芽胞杆菌，其检测限为10^6芽胞/ml[81]。

大量文献报道了不同检测技术在炭疽芽胞杆菌检测方面的应用，如流式细胞术、微分脉冲伏安法、荧光共振能量转移法、表面增强拉曼散射法、锁核酸探针技术和原子力显微镜等[82-83]。因为在感染过程中炭疽毒素高度表达，人们开发了除检测芽胞和（或）芽胞杆菌外，直接检测样本中的PA或LF的方法。PA-LF复合物由于代表了宿主的形式，它的定量检测可能更具临床意义。这样的方法早已有描述。一种方法利用偶联磁珠的抗-PA单克隆抗体，形成PA-LF免疫复合物沉淀，然后利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）定量检测肽键断裂的副产物[84]。另一种方法则经过MALDI-TOF MS验证

可定量检测血浆或血清中总LF，分别对383例和55例未感染的人和动物样本检测，显示100%的特异性。此外，通过四种传播方式感染的32例人类样本和53例吸入性炭疽动物样本的敏感性为100%[85]。该方法可用于炭疽的早期诊断，具有较强的稳定性。MALDI-TOF MS技术用于可疑粉末的检查[86]。这种方法能够准确地将芽胞与普通具有迷惑性的物质、炭疽芽胞杆菌与其他的芽胞杆菌区别开来。利用三氟乙酸[87-88]和γ射线[89]成功将炭疽芽胞杆菌灭活，是将BSL-3级微生物在BSL-2实验室进行MALDI-TOF MS操作的先决条件。然而，这也表明，试管提取法最后需要一个过滤步骤来确保去除活的芽胞杆菌的芽胞[90-91]。一种由基因工程产生的生物发光性报告噬菌体能够在5 h内从环境样本模拟血样中检测出临床相关浓度的炭疽芽胞杆菌，该法还可用于快速药物敏感试验[92-93]。上述及其他新的方法使在疾病早期检测到炭疽芽胞杆菌并获得更有效的治疗成为可能。

七、分离过程

(一)需氧芽胞杆菌分离

根据标准方法应将患者样本接种到血琼脂平板上。虽然在临床实验室并不常用，但加热处理(如70℃，30 min或80℃，10 min)对分离需氧芽胞杆菌具有富集作用。在高温作用下，其他微生物(如不形成芽胞的污染菌)被杀死，但具有高温抗性的芽胞能够存活，而且，热休克作用可使芽胞进入萌发过程。一般而言，对于新鲜的临床样本热富集过程并不适宜，因为这类样本中芽胞数量很少甚至缺如，而样本中的繁殖体细胞则可被热杀死。当怀疑蜡样芽胞杆菌食物中毒时，可将含有多黏菌素(100 000 U/L)的营养肉汤或胰酶大豆肉汤添加到经热处理的粪便样本中。

对于大多数需氧芽胞杆菌而言，尚无选择性培养基可以选择。但是，人们设计了用于蜡样芽胞杆菌群细菌分离、鉴定和计数的培养基。这些培养基的设计基于微生物的表型特征，包括阳性卵黄反应(即磷脂酶C活性)和阴性甘露醇产酸反应。添加丙酮酸盐和多黏菌素于这些培养基中能提高它们的选择性。效果好的配方包括BCM(蜡样芽胞杆菌培养基，LabM，Heywood，United Kingdom)，PEMBA(多黏菌素B、卵黄、甘露醇、溴百里亚甲蓝琼脂，Oxoid和LabM)和MYP琼脂(甘露醇、卵黄、多黏菌素B琼脂、Oxoid和Hardy Diagnostics，Santa Maria，CA)。新的配方包括BACARA、蜡样芽胞杆菌群平板培养基(Biosynth Chemistry and Biology，Staad，Switzerland)、蜡样芽胞鉴别培养基(Cereus-Ident-Agar，MilliporeSigma，Billerica，MA)和蜡样芽胞杆菌/苏云金芽胞杆菌显色平板培养基(R&F Laboratories，Downers Grove，IL)，其中用磷脂酶C特异的色源性底物代替卵黄以反映其酶活性。炭疽芽胞杆菌的选择培养基包括PLET琼脂(多黏菌素-溶菌素-EDTA-铊乙酸)和一种鉴别/选择显色培养基，R&F炭疽色源琼脂(R&F Laboratories)。独立研究提示，这2种培养基对分离炭疽芽胞杆菌都是有效的，但PLET琼脂的敏感性和选择性更好。

(二)炭疽芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌炭疽生物型的分离

假如能够遵守标准实验室操作要求，可在常规临床微生物学实验室(如哨点实验室)安全地进行炭疽芽胞杆菌(也适用于蜡样芽胞杆菌炭疽生物型)的分离和排除工作。炭疽芽胞杆菌生长迅速，培养仅8 h即可在血平板上观察到。在疑为炭疽芽胞杆菌时，必须将分离株送到具有鉴定炭疽芽胞杆菌能力的LRN参考实验室。由于该菌所具有的传染性，所有样本都需要在二级生物安全实验室中，按照三级生物安全实验室防护要求进行操作处理[详见本书第15章和《微生物学和生物医学实验室生物安全》(https://www.cdc.gov/biosafety/publication/bmbl5/bmbl.pdf)]。对于涉及临床和环境样本常规处理过程的实验室工作人员，推荐在三级生物安全实验室中进行工作，但不需要事先接种疫苗[94]。当工作涉及炭疽芽胞杆菌纯培养时，实验室工作人员面对的主要危险是破损皮肤与培养物或污染的实验室台面直接或间接接触，偶尔也可发生肠道外接种，较为罕见的风险是暴露于传染性临床样本。频繁离心处理炭疽芽胞杆菌悬液的实验室应使用可反复高压灭菌的、密闭气溶胶的离心转子。在美国，发生职业暴露或发生微生物泄漏于围护区域的基础屏障之外(如泄漏于开放的工作台上)时，需要填报APHIS/CDC的表3(《特定生物因子的毒素盗窃、丢失或泄漏信息报告

表》,www. selectagents. gov/form3. html)。

在美国,实验室保存炭疽芽胞杆菌需要向CDC或APHIS登记注册。当实验室鉴定发现炭疽芽胞杆菌时,其鉴定结果必须立即报告CDC或APHIS,并应在7天内填写并递交APHIS/CDC的表4(《特定生物因子及毒素的鉴定报告》,www. selectagents. gov/form4. html)。其他政府或权威部门应按照联邦、州或地方法律的要求予以通报。未登记注册的实验室(如诊断型哨点实验室)分离到炭疽芽胞杆菌,则必须采用认可的灭菌或灭活方法就地销毁细菌,或者在被确定为炭疽芽胞杆菌后的7天内将细菌转交给一个注册实验室。在加拿大,根据其人类病原体和毒素法案,所有含有或怀疑含有炭疽芽胞杆菌的物质必须提交到LRN实验室作进一步鉴定(https://www. canada. ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/human-pathogens-toxins-act. html)。相似的规定在其他国家也同样存在。

有多种不同样本需要确定是否有炭疽芽胞杆菌的存在,这些样本包括来自流行区的动物制品(如羊毛、兽皮、毛发和骨粉等)、来自于开挖的旧墓地、改建或重新开发的制革厂或实验室的土壤和其他材料及与炭疽暴发有关的其他环境材料等。针对这些样本的检查可能意味着从其他许多微生物,尤其是蜡样芽胞杆菌群的其他种微生物芽胞中寻找相对较少的炭疽芽胞杆菌芽胞。某些环境样品可能含有抑制炭疽芽胞杆菌发芽和生长的物质[9]。目前,没有炭疽芽胞杆菌富集方法,上文描述的选择性培养基是最好的方法。哨点实验室不能做这样的检测。

八、鉴定

需氧芽胞杆菌中水平的鉴定通常需要进行显微镜检查、菌落形态检查、生化试验等,同时也越来越多地用到核酸和蛋白图谱分析(如16S rRNA基因测序和MALDI-TOF)。

典型的芽胞杆菌呈革兰阳性,但其中一些革兰染色结果是不定或呈革兰阴性,尤其是类芽胞杆菌属和短芽胞杆菌属。相差显微镜和芽胞染色可用于区分芽胞和PHB颗粒,以及其他存储型内容物。对于一些种来说,如巨大芽胞杆菌,存储性颗粒确能辅助鉴定。此外,对于种间鉴别,芽胞囊的微观形态更有帮助。芽胞有圆柱形、椭圆形和球形等不同形态,偶尔可见豆形、肾形、弯曲的柱形和梨形芽胞。芽胞可以位于末端、近末端或中央,芽胞囊可呈膨胀样。尽管芽胞囊形态在种内和株内都会有变化,但对于一个有经验的实验人员,其形态特征足以使其对菌株进行初步的鉴定。苏云金芽胞杆菌的识别在很大程度上依赖于见到其在芽胞培养中形成的立方形或菱形的伴胞晶体(图27-2e)。

一般来说,繁殖细胞的形态学特征信息有限,但仍有助于种的鉴定。繁殖细胞宽为0.5～1.5 μm,长为1.5～8.0 μm。细胞或单个或呈链状排列。通常,细胞两端为圆形,但有些为方形或锥形(如蜂房类芽胞杆菌,*P. alvei*)。需氧芽胞杆菌的许多种都具有运动能力。

生长特征通常具有诊断价值。枯草芽胞杆菌和地衣芽胞杆菌具有相似的菌落和显微镜形态,但两者分别具有严格需氧和兼性厌氧的生长特性是不同的。巨大芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌两者的菌细胞均较大,但前者是专性需氧菌,后者则是兼性厌氧菌。

需氧性芽胞杆菌的菌落特征无论是种内还是种间都有较大变化(图27-3)。经24～48 h培养,菌落直径达1～5 mm,颜色自淡黄色、奶油色到灰白色,另有一些菌种还能产生橘黄色素。菌落形态则从湿润有光泽、颗粒状到褶皱状,其形状为从圆形到不规则形,有时呈波浪状或锯齿状整个铺开,形成毛齿状边缘。其高度可呈扁平、高起或凸起状。可见奶油状、黏液状或干燥的菌落,黏着在培养基上的菌落并非少见。在血平板上,可能没有溶血,或可见轻度溶血、部分或完全溶血。尽管表型多样,但一般情况下芽胞杆菌的菌落并不难辨认。

枯草芽胞杆菌和地衣芽胞杆菌具有相似的菌落,并且均非常多变,常常看起来像是混合培养。其菌落直径中等(2～4 mm),形状不规则,湿润、奶油状或黏液状,菌落边缘由于膜下黏液样基质存在而呈波状或毛齿状,菌落表面可有或没有串珠状黏液,随着黏液干燥菌落表面变得粗糙、发硬。地衣芽胞杆菌的地衣样菌落则较有强的黏附性。环状芽胞杆菌的亚群和类芽胞杆菌属(图27-3i)的一些种可观察到细菌微群落旋转和迁徙导致的扩散生长现象。

尽管不尽相同,但蜡样芽胞杆菌菌落是比较容易辨别的。它们的特征是菌落比较大(直径2～

7 mm)，形状自圆形到不规则形，可呈波浪状或锯齿状整个铺开，形成毛齿状边缘(图 27-3a～e)。它们通常具有无光泽或颗粒状的纹理，光滑和湿润的菌落比较少见。当蜡样芽胞杆菌群(包括炭疽芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌炭疽生物型，尽管其程度较轻)生长于卵黄琼脂培养基时，其合成的卵磷脂酶类能够在菌落周围产生不透明的沉淀环(常在过夜培养或孵育 24 h 后出现)(图 27-3k～l)。其最适生长温度为 37℃，其最低和最高生长温度分别为 15～20℃ 和 40～45℃。然而。常规对蜡样芽胞杆菌群的种间确定鉴别是具有挑战性的。每个种的生物学特征，包括炭疽芽胞杆菌的毒素和荚膜及苏云金杆菌的伴胞晶体等都是由质粒编码的。细菌获得或失去质粒就会改变特定菌株独有的特征而影响鉴定。炭疽芽胞杆菌和蜡样芽胞杆菌的菌落在表观上是非常相似的，菌落表面呈毛玻璃状，只是前者一般不溶血，并可沿接种线(“水母头”)形成尖峰和拖尾，但并不总是如此(图 27-3a 和 b)。与蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌通常所具有的奶油状菌落相比较，炭疽芽胞杆菌菌落则具有强黏性，可用接种环牵拉成尖峰状。炭疽芽胞杆菌的菌落对 γ 噬菌体敏感。蜡样芽胞杆菌炭疽生物型，顾名思义，同时具有蜡样芽胞杆菌和炭疽芽胞杆菌的表型特征[66-67]。与炭疽芽胞杆菌一样，菌落具有强黏性和不溶血(图 27-3e～f)，但经过长时间(48 h)孵育后，可出现轻微溶血。与蜡样芽胞杆菌一样，它对 γ 噬菌体裂解有抗性，并大多数可运动。它们可产生荚膜，并且

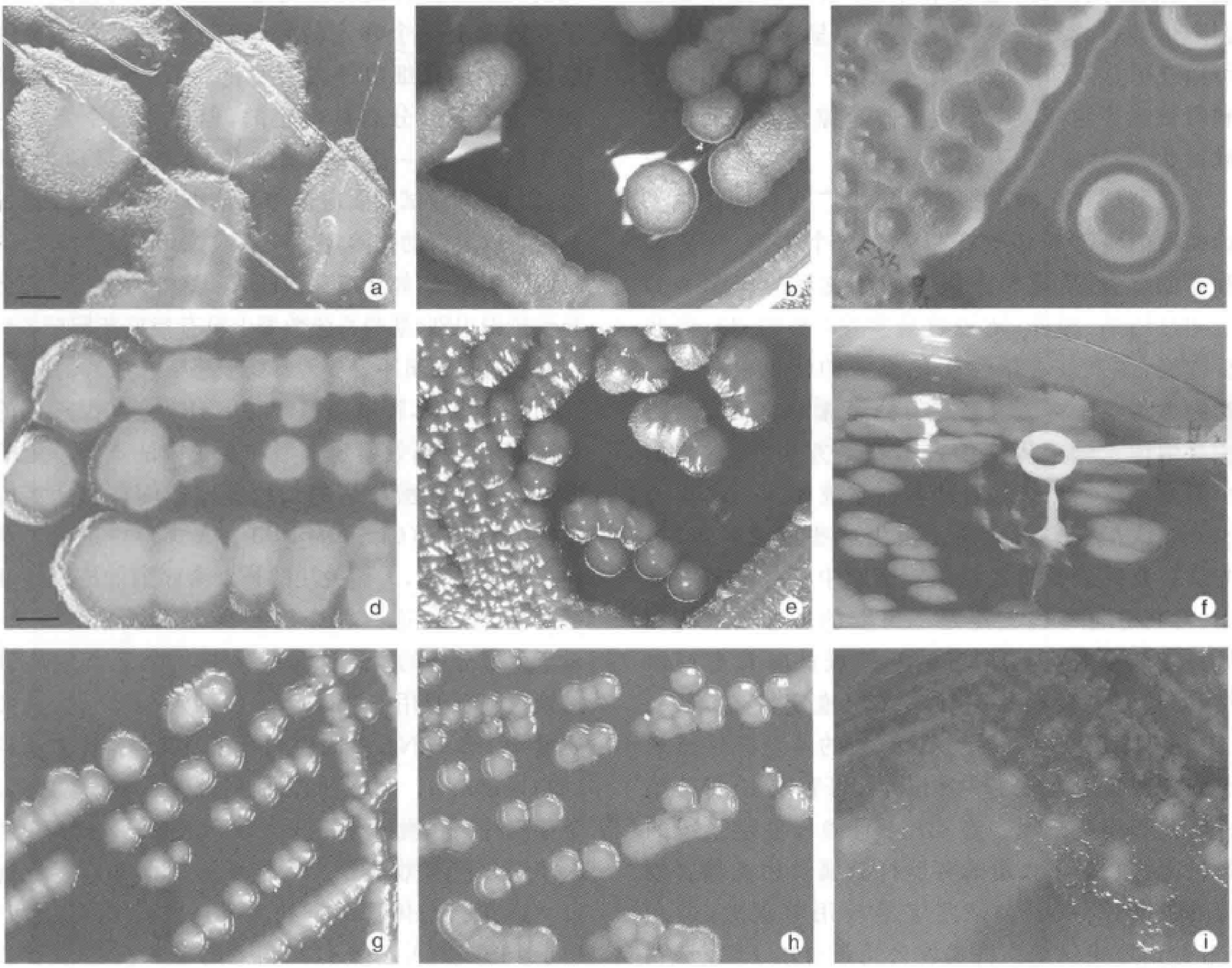


图 27-3　经 37℃ 24～36 h 培养的内生芽胞杆菌血平板上的菌落(a～i)和营养琼脂平板上的菌落(j)，以及卵黄琼脂平板上的菌落(k～l)，标尺：2 mm

注：a. 炭疽芽胞杆菌，可见逗点状凸起；b. 炭疽芽胞杆菌，边缘圆形整齐；c. 蜡样芽胞杆菌，可见双溶血环；d. 苏云金芽胞杆菌；e 和 f. 蜡样芽胞杆菌炭疽生物型(图片由加拿大温尼伯国家微生物学实验室生物物理分析发展和诊断项目的工作人员提供)；g. 巨大芽胞杆菌；h. 简单芽胞杆菌(*B. simplex*)，见彩插

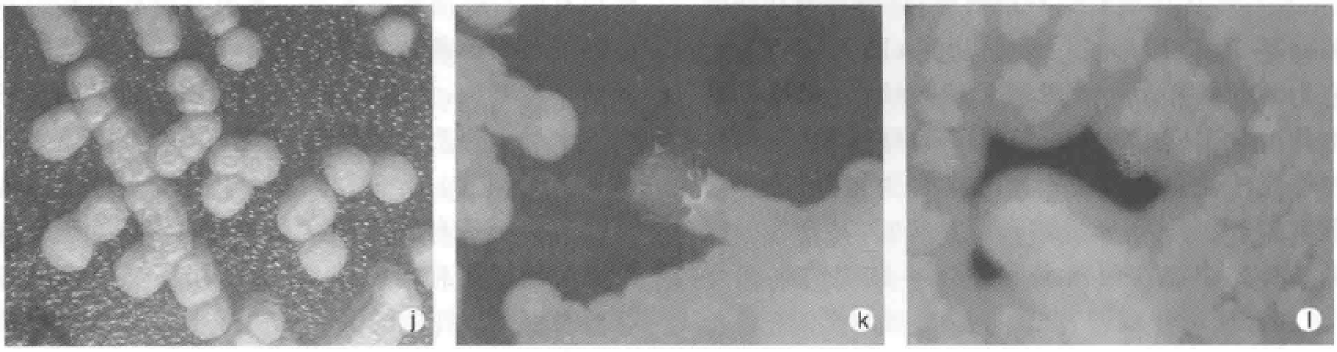


图 27-3(续)
注：i. 类芽胞杆菌属；j. 炭疽芽胞杆菌；k. 炭疽芽胞杆菌，移去菌落可观察到沉淀环；l. 蜡样芽胞杆菌，可见大量黏液

大多数菌落呈黏液状。炭疽芽胞杆菌在含 0.7% 碳酸氢钠的营养琼脂平板上，5%～7%的 CO_2 环境下(烛缸效果好)过夜培养，可刺激炭疽芽胞杆菌产生荚膜。有荚膜的细菌菌落呈黏液状，荚膜可用亚甲蓝或印度墨汁染色观察。蕈状芽胞杆菌和假蕈状芽胞杆菌产生覆盖整个琼脂表面的根状或发状、黏性菌落。

表型试验在种水平的鉴定中广泛应用。为了诊断目的将需氧芽胞杆菌分为 2 个类型：反应型和非反应型，反应型在很多的生化反应中都表型出阳性结果，因此，比较容易鉴定(表 27-2)，而非反应型，如果其有阳性生化反应的话也极少。在送到参考实验室请求鉴定的分离株中非反应型占主导地位。除了传统的表型检测方法外，常规的小型化系统，如 API，自动鉴别系统如 Vitek，以及 Biolog 也在实验室应用。使用这些鉴定系统时，非常重要的是要清楚如果数据库中不包括某一细菌，对其进行准确鉴定是不可能的。这些系统在区分蜡样芽胞杆菌群[95]的一些成员时具有局限性，但其可对炭疽芽胞杆菌作出推定性鉴定[96]。API 50CHB 可用于触酶阳性、大的革兰阳性需氧芽胞杆菌鉴定，经 24～48 h 孵育可鉴定 40 种芽胞杆菌及其相关菌属。在 GEN Ⅲ 微板鉴定系统的数据库中收录了大量的芽胞杆菌属及相关菌属细菌的数据(＞200)。该鉴定系统用时很短，可在 2 h 给出鉴定结果。梅里埃公司设计的 BCL 卡利用 Vitek 2 系统能够自动鉴定芽胞杆菌科的需氧芽胞杆菌[97]。总共有 52 个种可被鉴定，最终结果在 14 h 后就能获得，而常用的革兰阳性鉴定卡不包括芽胞杆菌属。BD Phoenix 微生物自动检测系统在其革兰阳性菌鉴定数据库中存储了 12 个芽胞杆菌及其相关细菌的资料。商用数据库在逐渐扩展和不断完善，但要紧随分类学变化和不断涌现的需氧芽胞杆菌新种则是一个极大的挑战。为了有效鉴定一个特定的种，诊断数据库必须要能够清楚地阐释细菌种内的变化。虽然许多新种是基于一个单一分离株而定的，但建立一个强大的谱系数据库需一系列来源的多个"真正可信"的菌株，因此，商业试剂盒应该与其他方法结合用于菌种鉴定。以上自动化鉴定系统不应该用于鉴别可疑的高风险病原体，如炭疽芽胞杆菌。这样的做法可能会导致错误识别(某些系统数据中没有炭疽芽胞杆菌)，并使实验室人员不必要地暴露于感染。

基于核酸，特别是基于 16S rRNA 基因序列的检测方法，可高效鉴定表型和生化方法无法鉴定的菌株。基于核酸序列的细菌鉴定指南在临床实验室标准研究所(CLSI)的 MM-18A 文件中进行了概述[98]。在过去，人们关注的是参考序列的准确性和可及性，然而，这些如今已经得到了很好的解决。对于大部分种的模式株和参考株，尤其是当 BLAST 搜索仅限于使用"16S rRNA 序列"数据库时，其高质量的 16S rRNA 基因序列可在公共数据库中获得(如 GenBank)。某些种，特别是蜡样芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌和炭疽芽胞杆菌等不能被 16S rRNA 基因序列分析有效鉴别。蜡样芽胞杆菌基因组包含 11～14 个核糖体操纵子和多个基因高变区。一个位于 16S rRNA 基因 1139 位点的单 SNP(单核苷酸多态性)已被确认是炭疽芽胞杆菌的特异性基因，但如果不使用碱基序列分析和(或)电泳分析检查，可能无法检出[99]。16S～23S 基因转录间隔区的特征性序列可将炭疽芽胞杆菌与蜡样芽胞杆菌群区分开来[100]。

表 27-2 芽胞杆菌属、土壤芽胞杆菌属和类芽胞杆菌属部分种的鉴别特征[a]

特性[b]	芽胞杆菌属													土壤芽胞杆菌属	类芽胞杆菌属		
	枯草芽胞杆菌群				蜡样芽胞杆菌群						环状芽胞杆菌群						
	枯草芽胞杆菌	解淀粉芽胞杆菌	地衣芽胞杆菌	短小芽胞杆菌	蜡样芽胞杆菌[c]	炭疽芽胞杆菌	苏云金芽胞杆菌	蕈状芽胞杆菌	产细胞毒素芽胞杆菌	巨大芽胞杆菌	环状芽胞杆菌	坚强芽胞杆菌	凝结芽胞杆菌	嗜热嗜脂肪芽胞杆菌	多黏芽胞杆菌	蜂房类芽胞杆菌	软化类芽胞杆菌
平均直径(μm)	0.8	0.8	0.8	0.7	1.2	1.2	1.2	1.2	≥1.0	1.4	0.8	0.8	0.8	0.9	0.9	0.8	0.7
链状排列	(−)	(+)	(+)	−	+	+	+	+	(+)	+	−	(+)	V	V	−	(−)	−
动力	+	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+
胞子囊[d]																	
形状	E	E	E(C)	C,E	E(C)[E]	E	E(C)	E	E	E,S	E	E(C)	E(S)	E	E	E	E
位置	S,C	S,C	S,C	S,C	S,C	S	S	S(C)	S,C	S,C	S,T	S,C	S,C,T	S,T	S(C)	S,C	S(T)
芽胞囊膨胀	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	V	+	V	+	+	+
伴胞晶体	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
厌氧生长	−	−	+	−	+	+	+	+	+/w	−	+	+	+	−/w	+	+	+
50℃生长	V	V	+	V	−	−	−	−	+	V	+	V	+	+	−	−	V
65℃生长	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−
卵黄反应	−	−	−	−	+	+	+	+	+/w	−	−	−	−	−	−	−	−
水解酪蛋白	+	+	+	+	+	+	+	+		+	W	W	−	+/w	+	+	−
淀粉水解	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+
精氨酸双水解酶	−	−	(+)	−	V[(−)]	−	+	V	+	−	−	−	V	−	−	−	−
吲哚产生	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−
硝酸盐还原	+	+	+	−	(+)[+]	+	+	(+)	+	V	V	+	V	V	+	−	V
产气	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+
V-P 试验	+	+	+	+	+	+	+	V	+/w	−	−	−	V	−	+	+	−
产酸																	
D-阿拉伯糖	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
甘油	+	+	+	+	+[V]	−	+	+	−	+	+	V	+	W	+	+	+
糖原	+	+	+	−	+[−]	+	+	+	−	+	+	V	−	+	+	V	+
菊粉	(+)	−	V	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	V	+	−	+
甘露醇	+	+	+	+	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	+	−	+
水杨苷	+	+	+	+	+[−]	−	(+)	(+)	+	+	+	−	V	−	+	V	+
D-海藻糖	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	V	+	+	+	V	+

注：[a]+.≥85% 阳性；+/w. 阳性或弱阳性；w. 弱阳性；(+).75%～84% 阳性；v. 可变性(26%～74% 阳性)；(−).16%～25% 阳性；−.0%～15% 阳性；−/w. 阴性或弱阳性。[b]API 20E 条板(bioMérieux)采用精氨酸二水解酶试验、吲哚试验、明胶水解试验、硝酸盐还原反应进行检测，API 50CHB 系统(bioMérieux)采用碳水化合物分解产酸反应进行检测。[c]表格中显示的结果为与呕吐型食物中毒暴发相关的被分离的生物型，菌株 1、3、5 和 8 的血清型通常与暴发有密切关系。[d]芽胞形状：C. 圆柱形；E. 椭圆形；S. 球形。芽胞位置：C. 中央或旁中央；S. 次极端；T. 极端。最可能的形态和位置列于前端，括号中显示的是不常被观察到的芽胞的形态和位置

近年来，人们热衷于使用 MALDI-TOF MS 平台进行细菌鉴定。目前主要利用的是 Vitek-MS(bioMérieux)，the MALDI Biotyper，和 the Andromas 3 个商业系统(第 5 章)。与表型鉴定方法一样，准确的 MS 鉴定的主要局限性在于是否建立了用于解释检测结果的强大数据库。IVD(体外诊断，FDA 批准)数据库可能没有包含最新的或不常见的种，对于密切相关的种，由于基因检测结果过于相似而导致不能被鉴别[14-15,101]。换句话说，这些数据库中的物种数量随着更新而不断增加。MALDI Biotyper RUO 文库(V4.1)包括了超过 100 个芽胞杆菌属和超过 70 个类芽胞杆菌属，其中许多种包含了多个菌株。此外，还有其他 37 个物种包括 10 个需氧内生芽胞杆菌属。同样的，Vitek MS V3 Plus/RUO 数据库包含了 40 个芽胞杆菌属、23 个类芽胞杆菌属，还包括了代表 8 个属的至少 23 个其他相关的物种。这些数据库包含的物种比临床环境常见物种或 IVD 数据库中的更多。然而，这样有助于减少"无法识别"发生。这些数据库可能没有包含最新的或不常见的物种，而亲缘近但临床不同的物种(如枯草芽胞杆菌群、环状芽胞杆菌群和蜡样芽胞杆菌群)可能太相似而无法区分。如不排除炭疽芽胞杆菌，则不应尝试用 MALDI-TOF 进行物种鉴定。除了没有过滤步骤而增加的安全隐患[90-91]，当前系统的局限在于炭疽芽胞杆菌群与蜡样芽胞杆菌群的其他种很难区分开来。此外，Bruker 和 Vitek IVD 数据库中不包括炭疽芽胞杆菌(和其他生物恐怖物种)，但它包括在 Vitek RUO 数据库和 Bruker 的一个单独数据库，其中包含了安全相关的生物型物种。当使用有生物恐怖物种的数据库时，会将蜡样芽胞杆菌、苏云金芽胞杆菌和蕈状芽胞杆菌错误地识别为炭疽芽胞杆菌，反之亦然[102-103]。使用实验室自己的菌株获得的质谱图数据库补充商业数据库能够帮助改善该方法的鉴定效果。人们利用高质量和庞大的质谱数据库确立 24 种炭疽芽胞杆菌和 18 种蜡样芽胞杆菌群的非炭疽芽胞杆菌物种，通过分别是 67% 和 83% 敏感性[104]的 2 个候选的生物标记峰，将 100% 特异性的非蜡样芽胞杆菌的炭疽芽胞杆菌分离出来。这种分析方法也将持续改进。

九、分型

现今仅仅制定了少数一些需氧型芽胞杆菌种的分型方案，其中包括了蜡样芽胞杆菌群(含炭疽芽胞杆菌)。文献报道了很多依据 PCR 和 DNA 序列分析的基因分型方法，但只有个别方法得到广泛接受，包括多点可变数目串联重复序列分析(MLVA)、多位点序列分型(MLST)及受到越来越多关注的全基因组测序(WGS)等。

MLVA 主要用于炭疽芽胞杆菌的分型。这是一种基于 PCR 产物片段的分析方法，该法分析位于炭疽芽胞杆菌染色体和毒力质粒上的 DNA 片段的拷贝数量。数量的不同可通过琼脂凝胶电泳或毛细管电泳进行分辨[105-106]。MLVA-8 方案针对是 8 个位点，其中 6 个位点位于染色上，另外两个分别位于 pXO1 和 pXO2 之上[106]。这是第一个能够可靠鉴别炭疽芽胞杆菌株的分型方法。在 2001 年生物恐怖事件中，MLVA-8 鉴别出 Ames 菌株是导致该起炭疽暴发事件的元凶[77]。随着靶位点增多 MLVA 的分辨率得到提高，并制定了使用 25 和 31 个靶点的分析方法[105,107]。MLVA 库(http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/)是 MLVA 分析的网上数据库和菌株间比较的宝贵资源。

MLST 是基于 DNA 序列分析的分型方法，通过检测"管家"基因 DNA 序列核苷酸多态性进行分型。由于 DNA 序列是明确的和可随时查阅的，因此 MLST 被看作是蜡样芽胞杆菌分型的金标准方法。报道的几个 MLST 方案中，每一方案都选定了各异的包括 6～7 个基因的一组基因。其中几个方案中的数据库可在网上获取，如 Priest(http://pubmlst.org/bcereus/)和 Tourasse-Helgason(http://mlstoslo.uio.no/)方案[108-109]，后者提供已公开发表的关于蜡样芽胞杆菌的 5 个 MLST 方案的数据。HyperCat 数据库(http://mistoslo.uio.no/)包含了超过 3000 株菌的分型数据，并支持 MLTS、多位点酶切电泳和扩增片段长度多态性等分析数据的比较[110]。尽管针对的目标基因有所不同，但 MLTS 对蜡样芽胞杆菌群分型给出了一致的结果。从基因分型的角度看，广义的蜡样芽胞杆菌存在异质性，在系统种群发生和传统的表型分型间相关性很差。

基因组测序分析(如全基因组 SNP 分析和 MLST 分析)正迅速成为菌株分型和分子流行病学的金标准。相对于 MLST 只包含了几千个核苷酸,基因组序列平均包括数百万个核苷酸,可揭示菌株间的差异,而这一点在使用其他方法时可能得到一致的结果。这种方法已经被用于调查 2001 年的生物恐怖事件[111],并用于检查广义蜡样芽胞杆菌群组成和炭疽芽胞杆菌进化研究[112-113],包括毒力基因和质粒的分布[5,114-116]。

基因组学方法也用于评估注射型炭疽病例相关的炭疽芽胞杆菌流行病学调查。据分析,有 2 株与欧洲的药物相关分离株。其 SNP 分析谱结果与流行病学数据调查一致,显示炭疽芽胞杆菌感染是由两次污染事件引起的。一株是与苏格兰 2009—2010 年病例有关,另一株是与丹麦、德国,以及英格兰和苏格兰 2012—2013 年期间的病例有关[13,117]。

基因组学方法正在被越来越多地用于其他需氧芽胞杆菌系统发育关系的研究,大多数是临床检测以外的,也被推荐用于阐释新物种的分类[118]。

十、血清学试验

已经开发出了炭疽病诊断的血清学试验,但是,由于其他需氧芽胞杆菌的原因未能用于炭疽感染的检测。在疾病暴发的情况下,因为血清转换需要时间,而有效的治疗和公共健康应急响应需要快速诊断,所以炭疽血清学试验的应用受到限制。此外,人类炭疽的早期治疗有时会影响抗体滴度的上升[78]。当然,血清学方法对于回顾性监测和流行病学调查方面是有价值的,同时也可用于监控疫苗免疫效果。2001 年生物恐怖事件后,血清学试验为病例确认提供了帮助[119]。

回溯源自 1911 年的 Ascoli 试验,是利用针对炭疽芽胞杆菌全细胞抗原的免疫血清进行免疫沉淀试验,可对感染提供快速的回顾性证据(即使是次选标本,包括解剖的动物尸体)。自无荚膜炭疽芽胞杆菌提取的热稳定炭疽杆菌素,是早在 1962 年便被许可用于人或动物的皮肤测试。假如注射炭疽杆菌素后出现迟发型变态反应,说明机体产生了针对炭疽芽胞杆菌的细胞免疫,该实验可在数年后监测疫苗诱导的免疫状态,还可用于炭疽病的回顾性诊断[120]。炭疽杆菌素并不包含高度特异性的抗原,其诊断意义是基于炭疽芽胞杆菌是芽胞杆菌中唯一可以在动物体内持续增殖的芽胞杆菌种的事实。

3 种炭疽毒素(PA、LF 和 EF)和针对它们的抗体可用于酶免疫分析系统。在炭疽感染的常规诊断或炭疽疫苗免疫反应的监测方面的应用,针对 PA 的抗体表现出了令人满意的结果,同时也表明可用于人或动物的流行病学调查。PA、LF 和 EF 可自商业渠道获得。在培养失败的情况下,可用针对 PA 抗体的血清学试验,以及 NAAT 或免疫组化实验结果确定炭疽感染的诊断。2001 年生物恐怖事件中,CDC 用酶联免疫吸附试验定量检测人类 PA 抗体免疫球蛋白 G (IgG),阳性结果仅仅在患炭疽或接受 AVA 疫苗注射的个体中出现[119]。Immunetics 开发了检测人类血清中的 PA 抗体 IgG 和 IgM 的定性试剂盒(Quick ELISA Anthrax-PA kit),该产品获得了美国 FDA 的批准并获准进入欧洲市场。

炭疽吸附疫苗(AVA)和其他疗法

炭疽吸附疫苗(anthrax vaccine adsorbed, AVA,亦称 BioThrax)可浏览美国的人类疫苗网站(http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ucm061751.html)。这是一种无细胞滤液(经福尔马林处理),由非包膜的、非水解蛋白的衍生物制备的 V770-NP1-R 株。经 FDA 批准,对 18～65 岁高危人群进行暴露前接种疫苗,先使用 3 剂方案(0、1 和 6 个月肌内注射),以及在 12 个月和 18 个月时口服。为了维持抵抗力,建议每年注射一次增强剂。炭疽沉淀疫苗(AVP)是目前英国流行的人体疫苗。它是在静态一次性培养无细胞滤液的 Sterne 株(34F2),采用活性炭来增加 PA 含量。AVA 和 AVP 都含有 PA,以及微量的 LF、EF 和细胞壁蛋白。2010 年,免疫实践咨询委员会(ACIP)对于暴露前后疫苗的接种和预防提出了最新的建议[94]。更新后的建议提出除了先前获批的职业性和实验室人群的外,还应包括新的设定来应对突发事件。ACIP 建议从事以下工作的人员常规接种 AVA:①接触高浓度的炭疽芽胞杆菌胞子或纯培养;②接触与炭疽调查相关的环境样本;③处于受芽胞污染地区或暴露于气溶胶化的炭疽芽胞杆菌胞子的其他设

施。对于紧急情况和其他反应者不建议常规免疫，但可作为综合职业健康和安全计划的一部分，自愿提供给从事现场调查、对可疑物质报告（如白色粉末事件）做出反应或进行其他可能导致气溶胶化的炭疽芽胞杆菌芽胞暴露的活动人员实施的安全措施。由于一般诊断实验室的工作人员按二级生物安全操作常规处理临床或环境的样本，不会增加接触炭疽芽胞杆菌芽胞的风险，因此，不建议进行 AVA 免疫接种[94]。

AVA 疫苗也被 FDA 批准用于疑似暴露的暴露后预防（0、2 和 4 周皮下注射），并与抗生素和支持疗法联合使用[121]。此外，FDA 最近批准了 3 种抗毒素疗法：雷昔库单抗（raxibacumab）、奥西单抗（obiltoxaximab 或 Anthim）和静脉注射炭疽免疫球蛋白[（AIG-IV，也称炭疽中和疗法（Anthracil）]。雷昔库单抗和奥西单抗是 2 种通过 FDA 动物疗效程序获批的生物制品，此外，AIG-IV 批准用于治疗吸入性或全身性炭疽，此外还可考虑适当的抗菌治疗[122-124]。

十一、抗菌药物敏感性试验

临床实验室标准研究所（CLSI）发布了关于炭疽芽胞杆菌药敏试验方法和药敏试验的首选药物，以及关于其他芽胞杆菌某些种的药敏试验解释标准的指南[125]。相关信息见本书第 76 章中。建议的方法是微量肉汤稀释法，也可用琼脂稀释法和 Etest 试验[126-129]。近来，利用激光散射技术的光学检测仪器快速检测（4 h 内）细菌药敏方法已用于临床，它能够实时检测细胞密度[130]，或通过自动数字延时显微技术[131]，实现了炭疽芽胞杆菌的抗生素试验检测和形态学观察。LRN 哨点实验室不做、也不应该做炭疽芽胞杆菌药敏试验。如果不能除外炭疽芽胞杆菌，哨点实验室应将分离株送交 LRN 参考实验室鉴定，参考实验室应将分离株递交联邦实验室（CDC）进行药敏试验、测序和存档。食品和兽医哨点实验室也应如此办理。

（一）炭疽芽胞杆菌

虽然也有例外的报道，但大多数炭疽芽胞杆菌菌株都对青霉素敏感[126-127,129]。然而，在某些分离株存在可诱导的 β-内酰胺酶，提示不能将青霉素作为治疗系统性炭疽的单一药物。炭疽芽胞杆菌菌株对环丙沙星、克林霉素、氯霉素、多西环素、左氧氟沙星、庆大霉素、四环素和万古霉素等也是敏感的[126-129]。相反，大多数炭疽芽胞杆菌对很多广谱和超广谱的头孢菌素，特别是头孢呋辛[126]、头孢曲松[127]和头孢噻肟[129]等敏感性较低（或不敏感），这就导致了治疗上药物选择的局限性[127]，同时，即使在体外试验敏感的结果也可能不能预测治疗效果。炭疽芽胞杆菌对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑（TMP-SMX）、红霉素和阿奇霉素也表现出低敏感性或耐药[127-129]。总的来说，炭疽芽胞杆菌的药物敏感性试验通常不是必需的，除了青霉素以外，CLSI 的药物折点也没有建立[125,132]。炭疽芽胞杆菌的药敏试验必须要在 BSL-3 实验室进行，首选药物为青霉素、多西环素、四环素和环丙沙星。

暴露于含炭疽芽胞杆菌芽胞气溶胶后的预防能防止吸入性炭疽的发生。推荐的预防方式是口服抗菌药物治疗 60 天并注射 3 剂 AVA 疫苗。选择抗生素时，应考虑抗菌药物耐药性问题。对于成人和儿童患者，推荐的一线药物是环丙沙星或多西环素[133]。虽然当使用左氧氟沙星治疗超过 28 天时，有关其安全性的资料有限，但左氧氟沙星推荐用作治疗成人患者的二线药物。对于妊娠妇女，推荐使用环丙沙星；当环丙沙星不能获得时，可以应用多西环素进行治疗[134]。如果自组织分离的菌株对青霉素敏感，则推荐采用阿莫西林进行治疗。当使用其他抗生素的安全性不能保证时，推荐将阿莫西林用于儿童和哺乳期妇女的治疗。克林霉素、氯霉素、利福平、万古霉素和其他氟喹诺酮类适用于不能耐受推荐抗生素的患者[133]。

由于严重的炭疽病例（如暴发性菌血症、吸入性炭疽、消化道炭疽或注射引起的炭疽等）常常累及脑膜病变，推荐静脉应用环丙沙星 7～10 天，并再加一到两种其他药物进行治疗[37]。如果存在炎症，环丙沙星的中枢神经系统透入率要高于多西环素。对单纯、自然获得的皮肤炭疽，推荐治疗为口服环丙沙星或多西环素 7～10 天，如果药物试验敏感，青霉素 V 或阿莫西林也可用于治疗。与生物恐怖相关的皮肤炭疽，由于有气溶胶暴露的风险，应按照暴露后预防治疗方案进行治疗。

（二）蜡样芽胞杆菌群（除外炭疽芽胞杆菌）

蜡样芽胞杆菌的抗菌药物敏感性的研究相对

很少，大部分信息来源于个案或暴发案例的报道。蜡样芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌产生青霉素酶和广谱β-内酰胺酶，因此，它们对青霉素、头孢菌素和联合使用的β-内酰胺酶抑制剂耐药[128,135]。部分菌株对TMP-SMX、克林霉素、四环素等中度敏感[128,135]。所有菌株都对亚胺培南、万古霉素敏感，大部分菌株对氯霉素、红霉素、庆大霉素、环丙沙星和达托霉素等敏感[128,135-136]。尽管如此，即便在治疗方案中包括了万古霉素，治疗失败的案例仍有报道。

口服环丙沙星成功地应用于蜡样芽胞杆菌创伤感染、菌血症和肺部感染的治疗。早期联用克林霉素和庆大霉素目前是蜡样芽胞杆菌眼部感染的最佳治疗方案。芽胞杆菌某些种（不包括炭疽芽胞杆菌）的药敏试验推荐的首选药物包括万古霉素、氟喹诺酮类和克林霉素，同时，许多抗菌药物敏感折点也有解释标准[125]。

（三）其他种

由于临床上有意义的芽胞杆菌属的其他种和相关菌属的检出率很低，关于这类菌种的药敏试验的资料匮乏。大部分可获得的信息都来自临床病例的个案研究，经验性使用抗生素，治疗可能有，也可能没有体外药敏试验结果的指导。作为环境微生物，芽胞杆菌某些种对通常使用的抗菌药物可能具有宽泛且不同的耐药性和敏感性模式。在分离自正常无菌部位并与临床吻合的情况下，实验室可依据CLSI批准的标准进行药敏试验[125]。药敏试验的首选药物包括万古霉素、克林霉素和氟喹诺酮类。非蜡样芽胞杆菌、非炭疽芽胞杆菌的其他芽胞杆菌临床分离株，在药敏试验中对万古霉素、达托霉素、庆大霉素、环丙沙星、亚胺培南、红霉素和TMP-SMX敏感[135]，而对青霉素、头孢菌素、氯霉素、克林霉素和四环素的敏感性不定[135]，对万古霉素耐药的菌株罕见，但有报道[137-138]。

十二、结果的评价、解释和报告

任何时候分离到炭疽芽胞杆菌都是有意义的，需要迅速报告，但大多数需氧芽胞杆菌是无害的环境微生物，不是专性致病菌。虽然经常可在微生物学实验室见到，但大多数分离株没有临床意义而不需报告。如在混合培养中，自皮肤拭子中分离出少量的化脓性链球菌，也可能报告正常皮肤菌群。同样地，如果自无菌部位在几种培养基或几份临床样本中分离出来，则需考虑与临床相关。然而，机会感染在某些情况下有报道过，需氧芽胞杆菌（其大多数是芽胞杆菌属）在临床上的重要性应被广泛认可。必须注意在将任一微生物作为污染菌处理之前，应充分考虑与其分离相关的临床环境。如果获得的分离菌是纯培养（至少是培养菌落中的优势菌），或者如果其数量很大，或者从多份临床样本中分离得到同一种菌，此时就要考虑其潜在的临床意义。蜡样芽胞杆菌眼部感染是严重的紧急情况，应该立刻报告临床医生（关键的结果）。在食源性疾病调查中，定性分离检测是不够的，由于一过性无症状粪便携带的原因，需氧芽胞杆菌在食物中常出现低水平污染。理想状态下，为了确立怀疑的分离菌是食物中毒事件的病原体，需要在流行病学认定的食物当中分离到有显著数量的细菌（$>10^5$ CFU/g），同时应从患者而不是健康人群的急性期标本（粪便或呕吐物）中分离到有显著数量的同一细菌（基因分型、生物变种鉴定或质粒分型等）。对于蜡样芽胞杆菌食物中毒事件，亦应检测食物中的呕吐毒素和肠毒素。

在怀疑或确定有临床意义的情况下，如果分离株不是常见的“可疑分子”，则倾向于用DNA测序确定鉴定。理想情况下，与罕见而有潜在价值的菌种相关的核苷酸序列应提交给公共数据库，以方便其他实验室搜寻相同需氧芽胞杆菌的相关信息。

重要的是，要识别到含有毒力因子的蜡样芽胞杆菌，包括与炭疽杆菌相似，由质粒携带并能够在人体内引起炭疽样疾病的毒力因子。这些分离株应提交给参考实验室（或更高级别实验室）进行全基因组测序以确定表型。蜡样芽胞杆菌炭疽生物型存在于非洲一些国家的动物上，而炭疽的诊断至今仍然是难题。到目前为止，制动试验是主要排除炭疽杆菌的试验，由于大多数（但不是全部）蜡样芽胞杆菌炭疽生物型是可运动的，这试验已不再可靠。然而，用非溶血性污染标本推翻参考实验室也是不现实的。这些分离株临床上仍然很少见，应结合临床症状（如是否有炭疽样临床综合征）、旅行史（是否去过蜡样芽胞杆菌炭疽生物

型流行地区)，以确定或排除引起炭疽样疾病的炭疽芽胞杆菌、蜡样芽胞杆菌炭疽生物型和蜡样芽胞杆菌的菌株，而医疗人员与实验室人员的沟通必不可少。芽胞杆菌属相关内容一直都在更新发展。

参考文献请扫二维码查阅

第28章　李斯特菌属和丹毒丝菌属

NELE WELLINGHAUSEN

（吕火烊　译；刘文恩　审校）

一、李斯特菌属(*Listeria*)

(一)分类

李斯特菌属为革兰阳性、无芽胞、兼性厌氧杆菌，G+C 含量低，通常为 36～42 mol%。李斯特菌属隶属于芽胞杆菌目，李斯特菌科[1]。目前该属已经有 17 个种的细菌[2]。

单核细胞性李斯特菌(*L. monocytogenes*)因其对人的致病性，是该属中最重要的细菌。根据 16S rRNA 基因、氨基酸序列的系统发育分析及生化特征，将单核细胞性李斯特菌和伊氏李斯特菌(*Listeria ivanovii*)、马氏李斯特菌(*Listeria marthii*)、无害李斯特菌(*Listeria innocua*)、威氏李斯特菌(*Listeria welshimeri*)、斯氏李斯特菌(*Listeria seeligeri*)归属于同一个进化支，其中伊氏李斯特菌包含 2 个亚种，包括伊氏李斯特菌伊氏亚种(*L. ivanovii* subsp. *ivanovii*)和伊氏李斯特菌伦敦亚种(*L. ivanovii* subsp. *Londoniensis*)。该进化支的细菌最近被建议命名为狭义上的李斯特菌(*Listeria sensu stricto*)[2]。格氏李斯特菌(*Listeria grayi*)及一些最近报道的从环境和食物分离的其他菌种可能会被归类为广义上的李斯特菌(*Listeria sensu lato*)，它们在将来也可能会被归类为新属，因为这些细菌缺乏内在基因的表达，不太可能是人类致病菌[2]。

(二)特征

狭义上的李斯特菌(*Listeria sensu stricto*)为革兰阳性、兼性厌氧、无芽胞、无分支、形态规则的短杆状(长 0.5～2 μm，直径 0.4～0.5 μm)，菌体细胞呈单个或呈短链状排列。培养于陈旧或粗糙培养基时可呈丝状菌体，菌体长度可达 6～20 μm。温度调节鞭毛表达，在 20～28℃ 环境下培养，菌体可产生 1～6 根周鞭毛，菌体呈特征性翻滚运动。而在 37℃下，菌体运动缓慢。在营养培养基上 37℃培养 1～2 天，可形成直径 1～2 mm 的表面光滑蓝灰色的小菌落，透射光照射下可见狭窄的β-溶血素环。李斯特菌属可 0～50℃下生长，最佳生长温度 30～37℃，在 4℃下缓慢生长。本菌通常触酶阳性，但已有触酶阴性菌株在人群中致病的报道[3]。氧化酶阴性，分解 D-葡萄糖和其他糖类产酸，V-P 和甲基红试验阳性，几个小时内水解七叶苷，不水解尿素和明胶，不产生吲哚和 H_2S。细胞壁含以内消旋二氨基庚二酸为基础的直接交联肽聚糖和脂磷壁酸，不含分支菌酸，两个主要的细胞脂肪酸为 $Cai_{15:0}$ 和 $Cai_{17:0}$（分支链类）。广义上的李斯特菌(*Listeria sensu lato*)群的成员和狭义上的李斯特菌(*Listeria sensu stricto*)群的成员不同，它们能够还原硝酸盐为亚硝酸盐和缺乏运动性(格氏李斯特菌除外)[2]。

(三)流行病学和传播

李斯特菌属主要存在环境中且以腐生方式栖生。单核细胞性李斯特菌可从各种动物中分离到，如哺乳类、鸟、鱼和甲壳类。感染的动物可以表现为一过性带菌而无任何症状，也可能导致相应的疾病。由于分布广泛，单核细胞性李斯特菌有大量机会进入人类食品生产环节，导致新鲜的和加工的家禽产品、肉、水果、生牛奶、奶酪和熏制三文鱼等食品的污染。单核细胞性李斯特菌在 4℃有一定的繁殖能力，使人类在摄取被其污染的食物后引起感染的可能性大大增加。成人肠道中可持续定植非致病的李斯特菌属细菌，致病的单核细胞性李斯特菌可同样存在，但比例

较低，为1%～5%。尚未见妇女子宫阴道内携带李斯特菌文献报道。除了食品相关的感染外，已有关于医院暴发流行的报道，主要在新生儿病房中[4]。

各国报告李斯特菌病散发病例数通常在0.1～0.9/10万人。在美国发病率大约为0.27/10万人[5]。与此相反，在一些欧洲国家，近十年来李斯特菌病散发病例的发病率却在增加，从每年的0.4/10万人增加到1.0/10万人[6-7]。患有基础疾病者，如患有骨髓增生障碍、严重的免疫抑制、酒精成瘾、肝病、孕妇及年龄大于60岁的老人，罹患李斯特菌病的风险可比常人高100～1000倍[5,7-8]。

(四)临床意义

在成年人中，单核细胞性李斯特菌主要引起败血症、脑膜炎和以脑炎为主的中枢神经系统感染，病死率高达50%。李斯特菌引起的局部感染包括心内膜炎、心包炎、关节炎、骨髓炎、人工关节感染、脑脓肿、眼内炎、角膜炎、腹腔感染、胸腔感染和静脉导管感染[9-10]。通过直接接触，偶尔会发生伴有或不伴有菌血症的原发性皮肤李斯特菌病。此外，李斯特菌胃肠炎常引起发热、头痛和关节肌肉疼痛。绝大多数李斯特菌肠胃炎的病例都与食源性暴发流行相关，通常在摄入被大量细菌(10^5～10^9CFU/g或者CFU/ml)污染的食物后24 h内发生。

在孕妇中，单核细胞性李斯特菌经常会引起轻微自限性流感样病症。短暂的菌血症可以造成胎盘炎或羊膜炎。由于李斯特菌可以通过胎盘感染胎儿，造成早产、流产和死胎，胎儿病死率高达24%[11-12]。在新生儿中，李斯特菌病可表现为早发型和迟发型。早发型可能是由子宫内的感染造成的，呈现出肉芽肿性婴儿败血症，李斯特菌属可在人体(包括神经系统)内广泛传播。迟发型病例是指新生儿出生平均14天后出现李斯特菌病症状，这些病原菌的来源不明，可能来源于母亲的生殖道或环境中。在实验室从事单核细胞性李斯特菌研究工作的孕妇要特别小心。

人类李斯特菌病潜伏期在1天到2～3个月之间，孕妇病例的潜伏期(中位数28天)远高于中枢神经系统感染病例(中位数9天)和菌血症病例(中位数2天)[13]。李斯特菌感染剂量和宿主的个体易感性相关。一项恒河猴代替孕妇的剂量效应动物模型实验显示，口腔接触10^7CFU的单核细胞性李斯特菌可以导致50%的死胎[14]。单核细胞性李斯特菌经食物传播的相对公共卫生风险已在一些研究中详细评估[15-16]。

摄入单核细胞性李斯特菌之后，是否会发生侵袭性感染取决于病原菌和宿主因素，以及摄入病原菌的数量。机体对李斯特菌病的免疫力主要依靠细胞介导的免疫系统。单核细胞性李斯特菌能够从宿主细胞的液泡逃逸，从而使其能够侵入宿主肠道上皮细胞，并在胞质内增殖，通过宿主细胞的肌动蛋白运动，使细菌聚集，通过细胞膜假的豆荚状伸展将细菌扩散到邻近的细胞中[17]。李斯特菌的毒力基因主要集聚在一个8.2 kb的毒力岛上，毒力基因包括基因编码的内化蛋白A和B，还有李斯特溶胞素(一种溶血素)[18]。内化蛋白和上皮细胞钙黏蛋白(滋养层的受体)的相互作用，可促进李斯特菌从母体向胎儿的传播[19]。

伊氏李斯特菌主要使反刍动物致病，但已有文献报道患有基础疾病的人的全身系统性感染及一例孕妇感染所致的死产[20]。最近报道了第一例伊氏李斯特菌引起的脑膜炎[21]。

(五)样本的采集、运输和储存

血液和脑脊髓液标本适用于李斯特菌病的检测。在疑似罹患李斯特菌病的新生儿中，血液、脑脊液、羊水、呼吸道分泌物、胎盘/皮肤拭子、胃抽出物，或者胎便均有助于李斯特菌的检出。基于流行病学或罕见的肠胃炎病例的研究，粪便样本优于直肠拭子。总之，用于李斯特菌检测的标本采集过程不需要特殊的处理。

用于培养单核细胞性李斯特菌的临床标本应该尽快处理，在室温或4℃，48 h内保存或运送样本结果稳定。李斯特菌属具有耐冷特性，可在4℃储存更长时间，但应注意其冷增菌效应。每克粪便样本接种于100 ml的选择性肉汤培养基中，这些选择性肉汤包括佛蒙特州大学选择性肉汤、多黏菌素-吖啶黄-氯化锂-头孢他啶-七叶苷-甘露醇(PALCAM)增菌肉汤和李斯特菌属的营养的肉汤培养基，经与食物标本相似的处理过程后[22-24]，室温下连夜运输。然而，有关临床标本富集的价值尚无研究报道。为避免在较长的储存过程中，非无菌部位采集的标本中单核细胞性李斯特菌被

污染菌群过度生长所覆盖，应将标本储存在 4℃下 24～48 h，或者 -20℃冻存。

李斯特菌属培养物可在 -70～-20℃下长期冻存。李斯特菌属运输时，应接种于不含葡萄糖的琼脂斜面上，包装、运输应符合各个国家和国际上的有关规定要求。

(六)直接检查

脑脊液样本、血培养阳性样本及可得到的组织样本应进行直接镜检。一旦在脑脊液或者血培养标本中发现革兰阳性规则的短杆菌，就应该怀疑李斯特菌病。然而，单核细胞性李斯特菌因其可排列成 V 型或栅栏状(尤其是在阳性血培养标本的直接涂片玻片上)，易与棒状杆菌混淆。目前尚无批准用于检测临床标本中的抗原的商品化试剂盒，但 VIDAS Xpress 系统包括预富集(bioMérieux)已获得食品样品许可[25]。

先前描述的实验室自制 PCR 方法用于检测 CSF、粪便和肺组织单核细胞性李斯特菌[22,26-29]，可能对于有抗生素用药史的患者标本的检测显得尤为有效。新的 FDA 批准的 FilmArray 脑膜炎/脑炎分子检测试剂盒(BioFire)可以对脑脊液中的单核细胞性李斯特菌进行特异性检测，大约用时 1 h，但是目前李斯特菌临床检测的经验还是较少[30]。BioRad 公司的 Probelia 单核细胞性李斯特菌检测方法已通过评估可用于临床粪便标本的检测，其他的商品化试剂盒，如罗氏诊断公司的 LightCycler PCR、ABI 公司的 TaqMan 单核细胞性李斯特菌检测试剂盒和杜邦公司的 BAX System PCR 试剂盒均只能用于食物标本的检测。

一种基于基因芯片的核酸检测方法(Verigene 革兰阳性菌血培养检测试剂盒)能够特异性地检测阳性血培养中的李斯特菌，时间在 3 h 之内[31]。

(七)分离流程

无菌部位采集的标本接种于含 5%的羊血、马血或者兔血的胰酶大豆琼脂平板，平板置于 5% CO_2 培养箱中，35～37℃孵育至少 48 h。李斯特菌属菌落在含血的营养培养基上形成狭窄的 β-溶血环。血液样本接种到普通的血培养增菌培养基中。有菌部位采集的样本，如粪便、食品和环境标本应接种在李斯特菌的选择性培养基上。此外，食物和环境标本在接种到培养基前，应将标本接种到选择性肉汤培养基中进行增菌是比较合理的[23-24]。

用于李斯特菌培养的选择性琼脂培养基，包括氯化锂-苯基乙醇-拉氧头孢(LPM)培养基[32]、Oxford 培养基、改良 Oxford 培养基和 PALCAM 琼脂[22]。在 LPM 培养上，应使用带有亨利照明灯的立体显微镜观察菌落(放大倍数：15～25×，凹面镜放在与入射光呈 45°角的位置，光线斜照在载物台的培养皿上)，李斯特菌菌落呈蓝色，其他的细菌菌落呈淡黄色或橘色。Oxford 和 PALCAM 琼脂含有选择性物质，无须在倾斜的灯光下观察菌落。李斯特菌可水解七叶苷，在 Oxford 和改良 Oxford 琼脂培养基上，菌落呈黑色，直径为 1～3 mm。在 35～37℃培养 24～48 h 后，菌落周边可形成黑色的光环。在 PALCAM 琼脂培养基上，菌落呈灰绿色，直径约 2 mm，菌落中心呈黑色凹陷。

食物中的李斯特菌的检测，必须先进行增菌富集。在美国最常用于食物和环境标本检测的参考方法有 FDA 的《细菌学和检验手册》[24]和 USDA 使用的方法[23]，而在欧洲最常采用国际标准化组织(ISO)11290 的方法[33]。所有的方法均要求标本在选择性肉汤培养基中先进行增菌富集(FDA《细菌学和检验手册》方法用缓冲李斯特菌富集肉汤，USDA 方法用佛蒙特州大学肉汤培养基，ISO 方法用 Fraser 肉汤培养基)然后接种到选择性的琼脂培养基上[参见上文，及依据 Ottaviani and Agosti(ALOA)配制的李斯特菌琼脂培养基]，然后进行典型菌落的生化鉴定[23-24]。菌种鉴定是必要的，因为其他革兰阳性菌，如芽胞杆菌也可能在选择琼脂上生长[34]。

显色培养基可以选择性分离李斯特菌。显色培养基主要基于 ALOA 而来，包括 ALOAgar 培养基、BCM 单核细胞性李斯特菌培养基、Limono-Ident-Agar 培养基、Chromoplate 李斯特菌培养基、Oxoid 李斯特菌显色琼脂培养基、BBL CHROMagar 培养基和 O. A. 李斯特菌琼脂[35-38]。然而，所有这些琼脂培养基均无法区分单核细胞性李斯特菌和伊氏李斯特菌。快速 *L. mono* agar 培养基[39]可特异地区分单核细胞性李斯特菌。显色培养基具有与 Oxford 和 PALCAM 琼脂培养基不相上下的敏感性，而特异性略微逊色[35,37,39-40]。

(八)鉴定

以下试验可用于简单鉴别:革兰染色,悬滴法动力观测,触酶试验阳性,七叶苷水解试验阳性。分解 D-葡萄糖产酸和 V-P 试验阳性可以确认。

由于相似的菌体形态和生化特征,李斯特菌易与其他的革兰阳性菌混淆。依据革兰染色的菌体形态、动力、触酶试验,李斯特菌属可与链球菌和肠球菌属相区别。依据动力、触酶试验和 4℃下生长的特性,李斯特菌属可与丹毒丝菌属相区别(丹毒丝菌属不能在 4℃生长)。与乳酸杆菌属的区别主要是乳酸杆菌属无运力,触酶反应阴性。

李斯特菌属内种的鉴别至关重要,因为所有的菌种都会污染食物,而只有单核细胞性李斯特菌会引起公共卫生问题。基于形态学和生物化学特征,与医学相关的李斯特菌属的鉴别方案见表 28-1。在这些标志物中溶血素对于鉴别单核细胞性李斯特菌和最常分离到的不致病菌无害李斯特菌非常重要。

产生溶血素被认为是单核细胞性李斯特菌一种重要的毒力因素。在羊血琼脂平板上,单核细胞性李斯特菌菌落周边可产生非常狭窄的 β-溶血现象(图 28-1)。但是仅靠溶血素不能区别分离菌株是致病菌种还是非致病菌种,因为除了单核细胞性李斯特菌可产生溶血素外,伊氏李斯特菌、斯氏李斯特菌、无害李斯特菌也可产生溶血素[41]。

克里斯蒂-阿特金斯-芒奇·彼得森(Christie, Atkins, Munch-Petersen, CAMP)试验可以用来区分溶血的李斯特菌。该试验如下:在血平板上平行划种 β-溶血的金黄色葡萄球菌和马红球菌属 2 条接种线。将可疑菌株垂直划线接种于两条平行线之间,注意尽量靠近但不能接触两条平行线。单核细胞性李斯特菌溶血性减弱,斯氏李斯特菌与邻近的金黄色葡萄球菌溶血增强,伊氏李斯特菌与邻近的马红球菌溶血性增强(图 28-2)。然而 CAMP 试验的可信度是有限的,正如在美国农业部推荐的检测方法中[23],商品化的 β-溶血素检测试剂盒可以用来代替 CAMP 试验。

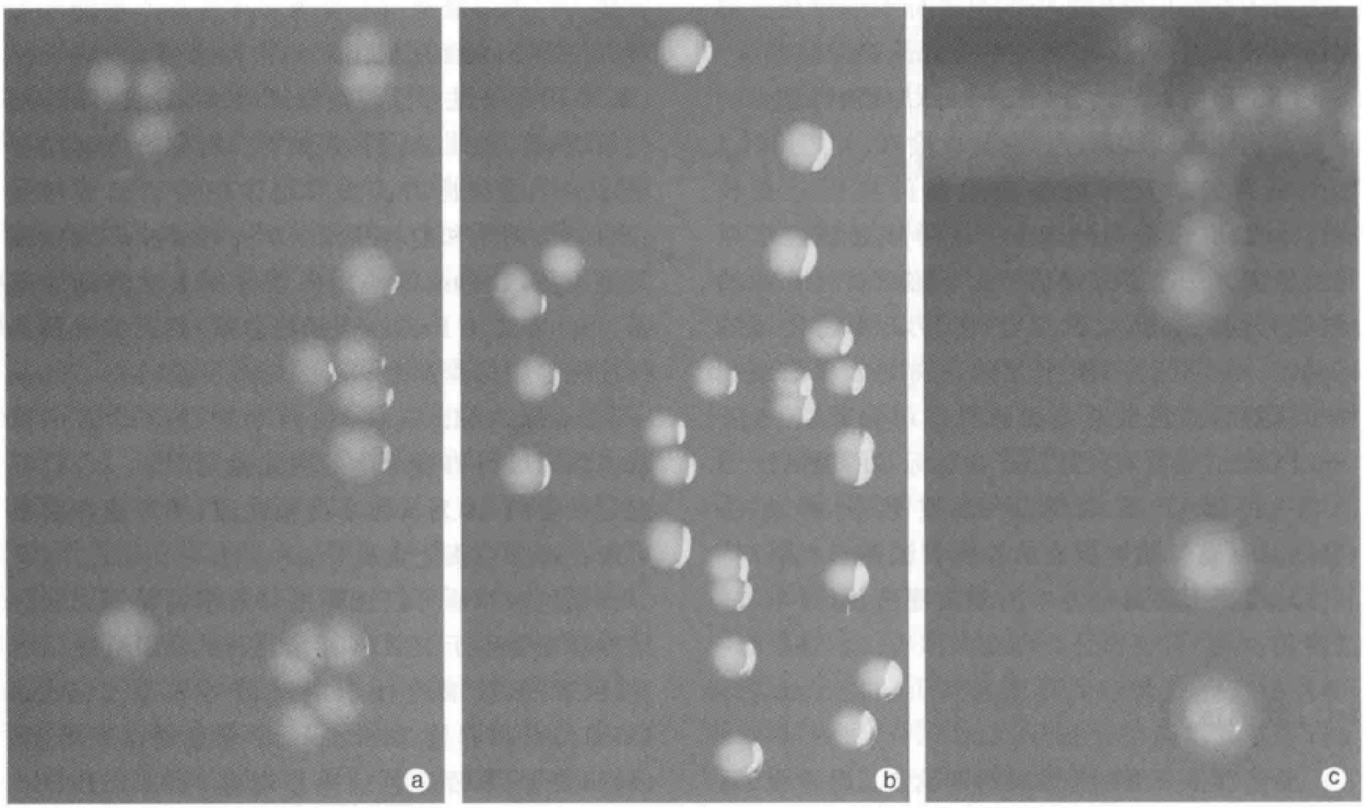


图 28-1 5%人血平板培养 24 h 后肉眼可见的菌落形态

注:a. 产单核细胞性李斯特菌:去除菌落,见菌落下 β-溶血区;b. 无害李斯特菌:无溶血环;c. 伊氏李斯特菌:菌落周围宽的 β-溶血环,见彩插

除了罕见的不典型的菌株外，单核细胞性李斯特菌 L-鼠李糖阳性，α-甲基-D-甘露糖苷阳性，D-木糖阴性，这些反应和特点可以用于生化鉴定（表 28-1）。生化反应管可能需孵育长达 7 天（37℃，需氧）。

商品化的微量生化鉴定试剂条极大地提高了李斯特菌属的生物化学鉴定的速度及准确性。API 棒状杆菌和李斯特菌鉴定条、Micro-ID *Listeria* 鉴定条、BBL Crystal Gram-Pos ID 鉴定条及 Microbact *Listeria* 12L 鉴定条均可准确鉴定到种水平。RapID CB Plus 系统只能鉴定到属水平。

表 28-1　李斯特菌属医学相关菌种和部分环境菌种之间的生化反应的鉴别[a]

特性	格氏李斯特菌	无害李斯特菌	伊氏李斯特菌伊氏亚种	伊氏李斯特菌伦敦亚种	单核细胞性李斯特菌	斯氏李斯特菌	威氏李斯特菌
β-溶血	−	−	++[b]	++	+	+	−
CAMP 试验[c]							
金黄色葡萄球菌	−	−	−	−	+	+	−
马红球菌	−	−	+	+	V	−	−
产酸							
甘露醇	+	−	−	−	−	−	−
α-甲基-D-甘露糖苷	+	−	−	−	+	−	+
L-甲基戊糖	V	V	−	−	+	−	V
可溶淀粉	+	−	−	−	−	ND	ND
D-木糖	−	−	+	+	−	+	+
核糖	V	−	+	−	−	−	−
N-乙酰丙酮-β-D-甘露糖胺	ND	ND	V	+	ND	ND	ND
马尿酸盐溶解	−	+	+	+	+	ND	ND
硝酸盐还原	V	−	−	−	−	ND	ND
相关血清型	S	4ab, 6a, 6b	5	5	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a 3b, 3c, 4a, 4ab 4b, 4c, 4d, 4e, 7	1/2a, 1/2b, 1/2c 4a, 4b, 4d, 6b	1/2b, 4c 6a, 6b

注：[a] +. ≥90%菌株阳性；−. ≥90%菌株阴性；ND. 未检测；V. 不确定；S. 特定型；[b] ++. 通常指宽区域或多区域；[c] 见文本与图 28-2

Vitek 2 系统、MicroScan WalkAway 系统、Micronaut 系统、Phoenix 和 Biolog 系统均可鉴定单核细胞性李斯特菌，所有以上的自动化检测系统均能提供准确的菌种鉴定。但 Vitek 1 系统只能将李斯特菌鉴定到属水平。

化学发光 DNA 探针法可从原始分离平板上快速鉴定单核细胞性李斯特菌，但马氏李斯特菌可引起假阳性。此外；肽核苷酸荧光原位杂交技术可快速和特异地鉴别单核细胞性李斯特菌和伊氏李斯特菌[42]。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）技术可以快速实现单核细胞性李斯特菌的鉴定，借助各自的分析软件（MALDI Biotyper, Bruker Daltonics; Billerica, MA; Vitek MS, bioMérieux; in-house databases）[43-48]。培养基的类型会影响鉴定的结果，不同的培养基会影响单核细胞性李斯特菌鉴定到种的成功率[49]。其他李斯特菌也可以使用 MALDI-TOF MS 鉴定，但是目前能够参考的数据非常有限[45,48]。

（九）分型系统

单核细胞性李斯特菌的分型，对于食源性感染疾病的病情研究是至关重要的。基于菌体“O”抗原和鞭毛“H”抗原，单核细胞性李斯特菌目前已知有 13 个血清型（分别是 1/2a、1/2b、1/2c、3a、3b、3c、4a、4ab、4b/4bX、4c、4d、4e 和 7）[50]。在大多数散发性感染和暴发性疫情病例中分离到的单核细胞性李斯特菌具有相同的血清型，如 1/2a、

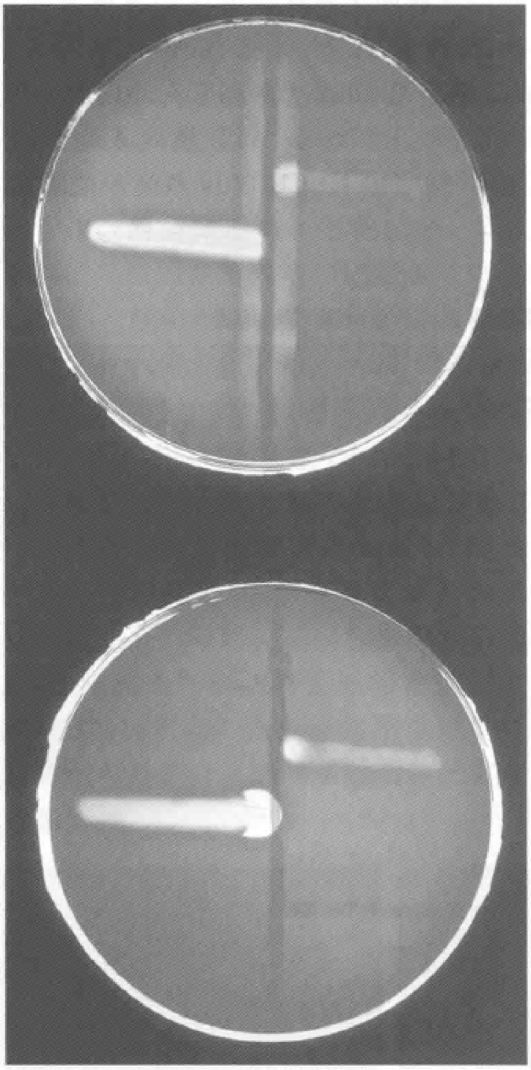


图 28-2 李斯特菌与金黄色葡萄球菌 CIP5710(上一平板)、马红肠球菌 CIP5869(下一平板)孵育 24 h 的 CAMP 试验。平板中右上为单核细胞性李斯特菌;右下为无害李斯特菌;左侧中间为伊氏李斯特菌,见彩插

1/2b 和 4b,由于这几种血清抗原为单核细胞性李斯特菌、无害李斯特菌、斯氏李斯特菌和威氏李斯特菌所共有,因此,血清型检测后必须对其进行进一步的鉴别。血清型只能作为初步鉴定或者作为对疑似暴发流行菌株进一步分型的一种选择方法。商品化的菌株分型抗血清可从 Difco 公司和 Denka Seiken 公司买到。经多个实验室比较研究认定,多重 PCR 方法可以用于鉴别单核细胞性李斯特菌的 4 个主要血清型(1/2a、1/2b、1/2c 和 4b)[50-53]。

MALDI-TOF MS 已成功应用于单核细胞性李斯特菌的快速分型,具有低成本、简单等优势。它可以清晰地分辨出单核细胞性李斯特菌的谱系和血清型[43,48],在菌株溯源也可以和脉冲场凝胶电泳(PFGE)相媲美[49]。

脉冲场凝胶电泳(PFGE)是单核细胞性李斯特菌的标准分型方法,其对 4b 血清型菌株的分型优势更为明显。有关脉冲场凝胶电泳法对菌株的区分能力和结果的重复性,已在许多研究中得到证实。为了保证脉冲场凝胶电泳法的质量和实验室间检测结果的可比性,应使用标准的实验检测方案。PulseNet USA 已经发布了一个耗时 1 天的方案(http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/listeria-pfge-protocol-508c.pdf),最近的一个多中心研究对该方案进行了完善和重新评估[54]。依据本方案,选用 ApaI 和 AscI 限制性内切酶。PulseNet Europe 的一项涉及 29 个国家参考实验室的能力验证试验显示分型结果高度一致,同时强调了遵守标准化方案的必要性[53]。将 PulseNet USA 和欧洲的 PFGE 标准检测方案进行比较,对食物和临床来源的单核细胞性李斯特菌的分型结果结果高度一致[55]。

非分子分型技术已经被更快和更简单的分子分型方法替代。如多基因位点可变串联重复分析和多位点序列分型(MLST),已经显示出很高的分辨率,可以与 PFGE 相媲美[50,56-57]。利用这些技术,对最近分离自加拿大李斯特菌病暴发流行的单核细胞性李斯特菌株进行分析,其优势 PFGE 克隆株的特性可追溯到 1988 年[58]。

最近,全基因组测序技术(WGS)的发展给单核细胞性李斯特菌的分型带来了革命性的变革,它是基于单核苷酸多态性的多位点基因分型和基于核心基因组的等位基因相似性分析,被称为核心基因组 MLST(cgMLST)[50]。cgMLST 策略可以将区别小于 10 个等位基因的细菌归类为暴发流行,该分型方法可以促进实验室之间的数据交换。WGS 可以用于李斯特菌的分型,并且这些李斯特菌使用当前的分型方法,例如,PFGE、MLST 和多基因位点可变串联重复分析无法区分,这对于李斯特菌的暴发流行调查提供了更高的分辨率[60-62]。基于 WGS 的李斯特菌血清型分型方案已经被发表,这种方案利用 cgMLST 策略[63]和高分辨率特定谱系 cgMLST 策略(当核心基因不足以区分时,会纳入辅助基因)[64]。李斯特菌 WGS 项目于 2013 年启动,涉及 CDC、FDA、USDA、NCBI 及州和当地的卫生部门,并预期能够囊括所

有在美国分离的，包括患者分离、食品分离、食物加工环境分离的李斯特菌。PulseNet 已经出版了 WGS 实验室标准方案（https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/protocols.html）。GenomeTrakr 数据库可以利用 WGS 数据来促进对李斯特菌病例和疫情的实时监控和跟踪。李斯特菌 WGS 项目已被证明对菌株分型和检测暴发流行非常有用[65]。尽管 WGS 将来可能会取代用于李斯特菌的各种分型方法，但它仍面临诸如标准化术语的定义，以及必要的技术平台和在全球范围内可用数据库的挑战。参考文献[28]和[50]中提供了用于单核细胞性李斯特菌分型方法的概述。

（十）血清学试验

针对李斯特菌溶血素“O”抗体检测的免疫印迹技术已用于李斯特菌病患者的血清学试验，本法的敏感性为 50%～96%，而补体结合试验和溶血素“O”凝集试验的敏感性明显低于前者[66]。有一种针对李斯特菌溶血素 O 的 IgG 抗体检测试剂盒已经可用，但是目前缺乏相关数据。血清学试验不推荐用于李斯特菌既往感染或急性期李斯特菌病的检测。

（十一）抗菌药物敏感性试验

目前为止，治疗李斯特菌病的最有效的抗菌药物为氨基青霉素。单核细胞性李斯特菌对氨苄西林体外耐药的散发病例已有零星的报道[67-68]，但这些研究所用的方法并不适合李斯特菌属的药敏试验，因此要十分慎重地解释这些报道。在其他的研究和综述中，未发现李斯特菌属体外对氨苄西林耐药[92-94]。由于氨基糖苷类药物和氨基青霉素药物具有协同作用，为此，两者常联合用于李斯特菌病的治疗。然而，在一个回顾性队列研究中，庆大霉素的增加并不能减少李斯特菌病早期或者晚期的病死率[72]。甲氧苄啶磺胺甲噁唑推荐用于治疗对青霉素过敏的患者，另外，美罗培南也可能是一种替代品，但是和青霉素、氨苄西林比较 30 天病死率增加[73-74]。单核细胞性李斯特菌对头孢菌素、磷霉素和夫西地酸具有天然耐药性，即使体外药敏试验敏感，头孢菌素也不应用于治疗。单核细胞性李斯特菌对四环素的耐药性需要特别注意，这是由于耐药性质粒的存在。单核细胞性李斯特菌对氯霉素、大环内酯类和四环素会产生多重耐药。抗革兰阳性菌的新药物，如利奈唑胺、替加环素、达托霉素和达巴凡星在体外具有较高的敏感性，其中利奈唑胺具有较好的临床疗效[75-78]。此外，体外药敏试验显示，单核细胞性李斯特菌对红霉素、莫西沙星和万古霉素敏感。对于怀疑治疗失败、罹患严重的疾病及青霉素过敏的病例应进行抗菌药物敏感性试验。CLSI 相关指南（M45-A3）提供了有关微量肉汤稀释法检测单核细胞性李斯特菌对青霉素、氨苄西林、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑和美罗培南 4 种抗菌药物的折点与解释标准[79]。

（十二）评估、解释和结果报告

从血液、脑脊液或其他无菌部位标本分离到单核细胞性李斯特菌可诊断为李斯特菌病。菌种鉴定是必需的，可将单核细胞性李斯特菌与非致病性李斯特菌区别开来。尤其是在使用免疫抑制剂、年龄大于 60 岁或小于 1 个月的患者，对上述提及的标本进行直接涂片镜检时，如果发现革兰阳性、规则的短杆菌，应及时与临床医生沟通，通过抗菌治疗及时根除单核细胞性李斯特菌。利用 MALDI-TOF MS 技术鉴定单核细胞性李斯特菌是一种非常有效的方法。粪便标本中检出李斯特菌很可能意味着定植，尽管有单核细胞性李斯特菌引起肠胃炎的散发病例报道，但在大便标本中筛查李斯特菌是无根据的。

用于脑膜炎标准抗菌疗法的头孢噻肟和头孢曲松钠，对单核细胞性李斯特菌无抗菌活性。对那些有可能治疗失败、患有严重疾病和青霉素过敏的患者，应进行抗菌药物敏感性试验。对于初始抗菌药物治疗后的脑脊液和血液标本，培养结果可能阴性。这种情况下，检测李斯特菌属的 DNA 可能更有意义[80]。目前尚无基于 PCR 方法检测脑脊液标本中单核细胞性李斯特菌的商品化试剂盒，但实验室内部的方案和多重 PCR 的方法可快速、特异性地检测单核细胞性李斯特菌 DNA。WGS 已经发展成为一种高分辨率的分型技术，可以实时检测单核细胞性李斯特菌暴发情况。

二、丹毒丝菌属(*Erysipelothrix*)

(一)分类

丹毒丝菌属在分类学上属于厚壁菌门丹毒丝菌纲(Erysipelotrichia)[81]。丹毒丝菌属目前已命名4个种，猪红斑丹毒丝菌(*E. rhusiopathiae*)，扁桃体丹毒丝菌(*E. tonsillarum*)，意外丹毒丝菌(*E. inopinata*)和幼虫丹毒丝菌(*E. larvae*)。只有猪红斑丹毒丝菌对人体有致病性。依据细胞壁肽聚糖抗原的不同可将猪红斑丹毒丝菌分成多个血清型(1a、1b、2a、2b、3、4、5、6、8、9、11、12、15、16、17、19、21)[82]。引起感染的血清型主要为1和2型。

(二)特征

丹毒丝菌属为兼性厌氧、无芽胞、无抗酸性、革兰阳性、两端钝圆的短杆菌(0.2～0.5 μm×0.8～2.5 μm)，呈单个、短链或长链状排列，菌丝细长无分枝(长度≥60 μm)，部分菌体染色不均。本菌属无动力，营养要求高，生长温度范围广(5～42℃均能生长，最适温度30～37℃)，适宜在碱性培养基上生长(pH 6.7～9.2均能生长，最适pH 7.2～7.6)。与李斯特菌属一样，丹毒丝菌属能在高浓度的NaCl培养基中生长(8.5% NaCl)。本菌属触酶和氧化酶均阴性，不分解七叶苷，葡萄糖发酵弱，不产气，甲基红和V-P试验均阴性，不产生吲哚，不水解尿素，在三糖铁琼脂培养基中产生H_2S。$C_{16:0}$和$C_{18:cis9}$为必需脂肪酸。

(三)流行病学和传播

猪红斑丹毒丝菌在自然界中呈全球性分布，在多种环境条件中均能生存。多种动物(如哺乳类、鸟和鱼等)的消化道或扁桃体可携带该病原菌，而其中猪最为常见。受感染的动物，不管是有临床症状还是无临床症状，均可以通过尿和粪便传播此菌，导致水和土壤的污染。

人类感染的猪红斑丹毒丝菌是一种人畜共患病。大多数病例均与职业暴露有关，此病在鱼业工作者、兽医和屠夫中发生得最为频繁。本病通过直接接触经皮肤擦伤、损伤或者动物咬伤而感染[83]。

(四)临床意义

猪红斑丹毒丝菌被看作是猪丹毒(一种急性或慢性疾病)的病原菌已有100多年了。感染部位周围2～7天内可形成局部蜂窝织炎。感染部位表现为肿胀、严重疼痛，皮损表面界限清晰，微微隆起，呈中心区淡、周围区渐深的紫色区域。可出现不化脓的囊泡，约1/3的患者会出现局部淋巴管炎，10%的患者会出现低热和关节痛。类丹毒的消退一般需2～4周，甚至几个月，经常会复发。猪红斑丹毒丝菌可播散，在多数情况下会表现为预后不良的心内膜炎[83]。猪红斑丹毒丝菌偶尔也可引起其他部位的感染，如腹膜炎、眼内炎、骨髓炎、颅内的和骨髓的脓肿、人工关节关节炎、肺炎及脑膜炎。

有关猪红斑丹毒丝菌发病机制的研究很少。猪红斑丹毒丝菌的荚膜由具有增强的抗吞噬作用的多聚糖抗原组成，这个荚膜具有抗吞噬作用，从而增强了其致病性。神经氨酸苷酶在细菌对宿主细胞的黏附和随后的入侵过程中起着非常重要的作用。69 kDa表面抗原SpaA、SpaB和SpaC似乎是猪红斑丹毒丝菌的主要保护性抗原，而重组的SpaA和SpaC可引起猪和小鼠的保护性免疫反应，因而成为潜在的候选疫苗[84-85]。已有文献报道使用多重实时PCR来检测表面抗原Spa型别[86]。

(五)标本的收集、运输和储存

从类丹毒病变部位采集的活检标本是猪红斑丹毒丝菌的最好来源。取样前，应仔细将病变皮肤洗净并严格消毒。猪红斑丹毒丝菌主要在损伤部位边缘的皮下深层，因此，应采集损伤部位边缘的整层皮肤的活组织，用于革兰染色和培养。取皮肤表面的拭子标本是检测不出本菌的。对播散性病例，可从标准的血培养或者感染部位的穿刺物中分离出猪红斑丹毒丝菌。应严格遵循标准操作程序对标本进行运输和储存。

(六)直接检查

对病变部位穿刺的标本、活检标本和阳性血培养瓶均应进行直接镜检。猪红斑丹毒丝菌革兰染色的形态，短杆状，长菌丝，不易从形态上区分。但从一个已知接触史的患者病变部位采集的病理

标本中，镜检发现革兰阳性细长菌丝，即提示类丹毒可能。值得注意的是，培养基上的菌株可能呈革兰阴性(见下文)。

已有文献报道，用常规和实时定量 PCR 检测动物组织中的猪红斑丹毒丝菌，以及用于鉴别扁桃体丹毒丝菌和猪红斑丹毒丝菌，但这些方法用作人体标本的检测尚未得到评估[87-89]。

(七)菌株分离流程

组织或活检标本应遵循第 19 章所述进行处理，即把一部分标本接种在血平板或巧克力血平板上，一部分标本接种在胰蛋白酶的大豆肉汤、斯氏肉汤或巯基乙酸盐肉汤中，35～37℃，需氧或 $5\%CO_2$ 环境下培养 7 天。标本不需特殊预处理，但是接种增菌肉汤能够显著增加检出率。败血症或心内膜炎患者的血液可以接种到商品化的血培养瓶中。猪红斑丹毒丝菌的菌落通常在培养 1～3 天后形成，培养 24 h 后可在血琼脂平板出现针尖状菌落(直径<0.1～0.5 mm)；培养 48 h 后，可出现两种不同的菌落。较小的菌落，表面光滑，圆形，透明，凸起，边缘整齐，直径 0.3～1.5 mm。较大的菌落，表面粗糙无光泽，扁平，不透明，边缘不整。37℃有利于粗糙型菌落生长，而 30℃有利于光滑型菌落生长。细菌在血平板上培养 2 天以后，在菌落下的血平板上，常会出现一个绿色区域[90]。

(八)鉴定

猪红斑丹毒丝菌为革兰阳性杆菌，但常呈革兰阴性，尤其是粗糙型菌落的细菌，会脱色，常染成革兰阴性，有时呈串珠状排列。光滑型菌落的细菌呈杆状或球杆状，有时呈短链状排列。粗糙型菌落的细菌呈长菌丝状，长度通常大于 60 μm。

猪红斑丹毒丝菌触酶阴性；硝酸盐还原试验(—)，脲酶(—)，不能水解七叶苷，明胶试验(—)，不能分解木糖、甘露糖、麦芽糖和蔗糖，能分解葡萄糖和乳糖，H_2S 试验阳性。H_2S 的产量易受培养基影响，在三糖铁琼脂培养基上产生的 H_2S 量最多。Vitek 2、Phoenix 全自动微生物检定系统和 API 系统(API Coryne 和 API ID 32 Strep 鉴定卡)都能准确地鉴定猪红斑丹毒丝菌。另外，MALDI-TOF MS 可以有效鉴定猪红斑丹毒丝菌[45,91-92]。

形态学和生物学特征与丹毒丝菌属相同的人类致病菌主要包括乳酸杆菌和李斯特菌[93]。菌体均为形态规则、无色素、无芽胞的革兰阳性杆菌。一个重要的鉴别点是猪红斑丹毒丝菌在三糖铁培养基中产 H_2S，而其他的种属不产生。某些芽胞杆菌也产 H_2S，但菌体形态、芽胞形成和触酶试验易将其与猪红斑丹毒丝菌区分。李斯特菌属通常触酶阳性，动力阳性，七叶苷阳性，无 α-溶血现象。棒状杆菌和链球菌有时易与猪红斑丹毒丝菌混淆，但通过菌体形态的差别、触酶试验的不同进行鉴别。另外，猪红斑丹毒丝菌的另一特性为在明胶穿刺培养试验中，22℃下可呈“烟斗通条”状[90]。

(九)分型系统

猪红斑丹毒丝菌存在于 3 个地理分布广泛的遗传进化枝中[94]。临床实验室可常规对菌株进行血清学分型，但由于很多分离菌株都属于血清型 1 或 2 型，所以它的应用价值有限。RAPD 扩增、扩增片段长度多态性分析法和核糖体分型法已证实对于猪红斑丹毒丝菌菌株的流行病学的分析极为有效[95-96]。在区分猪红斑丹毒丝菌菌株上，用 SmaI 内切酶的脉冲电场凝胶电泳(PFGE)方法优于 RAPD 扩增和核糖体分型方法[97]。对 *spaA* 基因高可变区的核酸序列分析也可用于区别某些血清型的猪红斑丹毒丝菌菌株[85,98]。最近发布的 MLST 方案基于对代谢途径中涉及的 7 个管家基因内部片段的核苷酸多态性的鉴定，将猪红斑丹毒丝菌认定为宿主特异性有限的弱克隆物种，与 PFGE 相比似乎不太适合暴发调查[99]。

(十)血清学试验

目前尚无用于检测人体猪红斑丹毒丝菌抗体的血清学试验。动物用的主动免疫疫苗已经研制成功，其保护性抗体可用酶联免疫分析法检测。

(十一)抗菌药物敏感性试验

青霉素或氨苄西林都可以用于局部和全身性感染的治疗。至今尚未发现对广谱的头孢菌素或氟喹诺酮耐药的菌株，这 2 类药物可作为合适的替代药物。在体外药物敏感性试验中，猪红斑丹毒丝菌对克林霉素、红霉素、达托霉素、亚胺培南和四环素均敏感[100]。值得注意的是，猪红斑丹毒菌丝对万古霉素天然耐药，通常也对氨基糖苷类

和磺胺类耐药。尽管不必对猪红斑丹毒丝菌进行常规抗菌药物敏感性试验，但对青霉素过敏的患者要进行红霉素、克林霉素或其他更多的抗菌药物的敏感性试验。关于丹毒丝菌微量肉汤稀释法抗菌药物敏感性试验的CLSI指南（M45-A2）已出版，其中给出了青霉素、氨苄西林、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢曲松钠、亚胺培南、美罗培南、红霉素、环丙沙星、加替沙星、左氧氟沙星和克林霉素的折点[79]。

（十二）评估、解释和结果报告

由于本菌引起的人类感染比较罕见，有关疾病的临床知识缺乏，类丹毒的诊断常因组织活检标本或血培养标本意外分离到猪红斑丹毒丝菌而明确。如果临床上没有怀疑为类丹毒，实验室要鉴定猪红斑丹毒丝菌较为困难。对临床标本直接革兰染色镜检，发现革兰阳性和革兰染色不定的杆菌，包括易脱色、串珠状排列、球杆状、细长菌丝状，提示可能为猪红斑丹毒丝菌。猪红斑丹毒丝菌的一个重要生化特性是产 H_2S。

临床标本分离到猪红斑丹毒丝菌必须报告。在创伤或组织标本中分离到猪红斑丹毒丝菌提示类丹毒而不是污染。正确的菌种鉴定可以确保充分的抗菌药物治疗。青霉素和氨苄西林通常是有效的，因而被推荐为治疗本菌的一线药物，治疗过程中要特别注意本菌对万古霉素天然耐药。

参考文献请扫二维码查阅

第29章　革兰阳性棒状杆菌

KATHRYN A. BERNARD

（吕火烊　译；刘文恩　审校）

本章讲述需氧生长、非孢子生殖、形状不规则、无抗酸性的革兰阳性杆菌，统称为棒状杆菌。"棒状杆菌"其实有误导作用，因为只有真正的棒杆菌属才呈现典型的棒状形态（古希腊语中"coryne"就是"棒状"之意），然而本章讨论的所有其他细菌都是不规则形态的。在本章中，偶尔会使用"棒状杆菌"一词作为这些分类群中每一种菌的统称。根据最近文献或当前实验室观察，所有这些分类群都已被发现或被怀疑与临床相关。Leal 等所描述的"类白喉"一词意味着从患者标本中分离的棒状细菌，但临床医生认为这是非致病性的，因此，这里不使用"类白喉"一词[1]。

因教学需要，棒状细菌如放线菌属（尤其是需氧平板上最常见的欧洲放线菌、纽氏放线菌、罗亚放线菌和图列茨放线菌）、放线杆菌属、丙酸菌属和产丙酸菌属（第 54 章）均不包含在本章，而隐秘杆菌属和储珀菌属（*Trueperella*）包含在本章。阴道加德纳菌包含在本章但会分开讨论。形状规则需氧生长或者耐氧的革兰阳性杆菌（芽胞杆菌属、李斯特菌属/丹毒丝菌属、乳杆菌属和第三梭菌）分别在第 27、28、54 和 55 章综述。部分抗酸杆菌和其他需氧放线菌，如诺卡菌属，以及分枝杆菌属，将在第 30～34 章中进行综述。

近年来，许多文章对本章所述的很多分类群的特征和所致感染进行了综述，这些出版物为读者提供了有价值的背景信息[2-6]。2015 年对毒力因子（多重耐药基因、黏附因子、毒素、磷脂酶 D 等）进行了综述[7]。与这些类群相关的主要细胞脂肪酸（CFAs）可以分为 2 个不同的类群：棒杆菌属、耳炎苏黎世菌、隐秘杆菌属、储珀菌属和阴道加德纳菌具有直链饱和及不饱和类型的 CFAs，而这里所述的所有其他分类群以支链类型的 CFAs 为主。读者可以参阅本手册第 11 版的第 28 章，以获取有关此处重点介绍的生物体的化学分类特征的详细信息[8]。

一、分类学

本章讨论的细菌都属于放线菌类，这些种属特征为具有特定的 16S rRNA 基因信号核苷酸[2,9]，属于高鸟嘌呤加胞嘧啶（G＋C）含量的革兰阳性菌谱系，微小杆菌属为例外，该类菌 G＋C 含量低，属于厚壁菌门。

使用 16S rRNA 基因测序及越来越多的通过全基因组测序（WGS）分析进行的亲缘关系研究总体上证实了由这些家族和属中发现的传统化学分类学研究所建立的框架。16S rRNA 基因测序数据[10-11]表明，棒杆菌科（棒杆菌属和苏黎世菌属）的成员与隶属于棒杆菌科的细菌最密切相关，包括部分耐酸属（第 30 章）和分枝杆菌属（见第 31～34 章）。根据 16S rRNA 关系或 WGS，本章中未涉及的所有其他革兰阳性杆菌与棒杆菌或苏黎世菌属密切相关；下文对它们分别进行描述，按科的字母顺序排列。

棒状杆菌在属或物种层面的分类变化和 WGS 推断，如果可用，将在本节中简要讨论。表 29-1 描述了从人类感染中恢复的更常见属的临床特征，一些更罕见的属仅在文中进行了描述。临床表现、生化试验、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）、药敏试验（AST）和 WGS（用于棒状杆菌）在下文"鉴定"中突出显示。罕见棒状杆菌的 WGS 数据很少，因此在"分类学"中进行了描述。这里仅讨论有效描述和有效命名的属和种，以原核生物命名目录（List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature，LPSN）为主要参考，但不是唯一参考（http://www.bacterio.net/）。

表 29-1 与人类疾病相关最常见的棒杆菌属细菌[a]

菌名	疾病或疾病相关性
无枝菌酸棒杆菌	伤口感染、菌血症、败血症、尿路感染
金色黏液棒杆菌	泌尿生殖道感染、伤口感染、菌血症
科伊尔棒杆菌	菌血症、尿路感染
白喉棒杆菌(产毒)	咽部白喉、皮肤白喉
白喉棒杆菌(非产毒)	心内膜炎、异物感染、咽炎、败血症
解谷氨酸棒杆菌	泌尿生殖道感染(主要男性)、菌血症
杰氏棒杆菌	心内膜炎、菌血症、尿路感染、异物/伤口感染
克氏棒杆菌	肉芽肿性小叶性乳腺炎,脂肪肉芽肿
麦氏棒杆菌	眼部感染,VAP,伤口感染,菌血症
丙酸棒杆菌	呼吸道感染,心内膜炎,角膜炎
假白喉棒杆菌	呼吸道感染,心内膜炎,泌尿道感染,伤口
假结核棒杆菌	淋巴结炎(职业性,通常是动物病原体)
多耐棒杆菌	菌血症
模仿棒杆菌	伤口,菌血症,尿
纹带棒杆菌	伤口,呼吸道感染,异物感染,菌血症,泌尿道感染,脑脊液(分流感染)
结核硬脂酸棒杆菌	导管感染,菌血症,心内膜炎,伤口感染
溃疡棒杆菌(产毒)	呼吸道白喉, 皮肤感染
解脲棒杆菌	尿路感染,菌血症,伤口感染
苏黎世菌属	耳部感染或共生
节杆菌属	菌血症,异物感染,尿路感染
罗氏菌属	牙周疾病,心内膜炎,菌血症,呼吸道感染,泌尿生殖道感染
短杆菌	菌血症,异物感染,尿,眼(耳炎短杆菌,黄体短杆菌),心内膜炎,腹膜炎
纤维单胞菌属	菌血症,心内膜炎,藏毛囊肿,胆囊炎
人皮杆菌	脓肿,菌血症,骨髓炎,腹膜炎,皮肤病变,眼,伤口
纤维微菌属	异物感染,菌血症
微杆菌属	菌血症,异物感染,伤口感染
溶血隐秘杆菌	大龄儿童/年轻人的咽炎,伤口和组织感染,心内膜炎,菌血症
伯纳德储珀菌	脓肿形成,菌血症,坏死性筋膜炎
化脓储珀菌	脓肿形成,伤口和软组织感染
阴道加德纳菌	细菌性阴道病,子宫内膜炎,产后败血症,伤口感染,菌血症,尿失禁

注:[a] 仅描述了 18 个最常见的棒杆菌属,罕见菌属另请参见参考文献[2-5][82](棒杆菌属)[30][52][59][78-80][246][249-250][256-258]和[270]

二、科属的概述

(一)棒杆菌科

1. 棒杆菌属 棒杆菌属有 105 种(http://www.bacterio.net/corynebacterium.html;至 2017 年 8 月),其中约 1/2(56 种)已被证明可引起人类感染,或可从动物传染给人,导致人类感染。本书已描述了其中 2 种:劳氏棒杆菌(*Corynebacterium lowii*)和眼棒杆菌(*C. oculi*),并且发现以前仅从犬身上分离的犬耳棒杆菌(*C. auricanis*)在人被狗犬伤后导致了伤口局部感染[1,13]。

属于该属的化学分类学特征内消旋二氨基庚二酸(m-DAP)和直链、单不饱和或饱和的 CFAs 已在前面概述过[2,8]。短链分枝菌酸存在于除无枝菌酸棒杆菌和克氏棒杆菌之外的所有医学相关物种中,WGS 发现它们缺乏合成分枝菌酸酯所必需蛋白质的合成基因[14]。相反,薄层色谱法发现非典型棒杆菌虽缺乏分枝菌酸酯[15],但是具有合成它们所需的基因[14]。棒杆菌属的 G+C 含量在 46~74 mol%之间,表明该属内菌种间差异巨

大[2,5]。美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站上提供了几乎所有与医学相关的棒杆菌属物种的完整基因组或草图,但需注意,许多菌株并不是典型的标准菌株(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/)。临床相关棒杆菌属的基因组大小在1.8~2.9 Mb 之间,WGS 数据提供了一种精确的方法来计算每个分类单元的 G+C 含量。

棒杆菌的革兰染色表现为略微弯曲,革兰阳性,侧边不平,末端略膨大,使得部分细菌呈现典型棒状(图 29-1a、e、g)。与上述形态不同的棒杆菌包括犬棒杆菌(*C. canis*)、坚硬棒杆菌(*C. durum*),马氏棒杆菌(*C. matruchotii*)(图 29-1f)和松兹瓦尔棒杆菌(*C. sundsvallense*),通常菌体染色均匀。液体培养基中生长的棒杆菌可排列成单细胞,成对,"V"形,栅栏形或中文文字型。棒杆菌属所有医学相关的分类群都是触酶阳性且无动力。大多数种类是氧化酶阴性的。另外,棒杆菌属包括发酵、氧化和不反应群[2]。

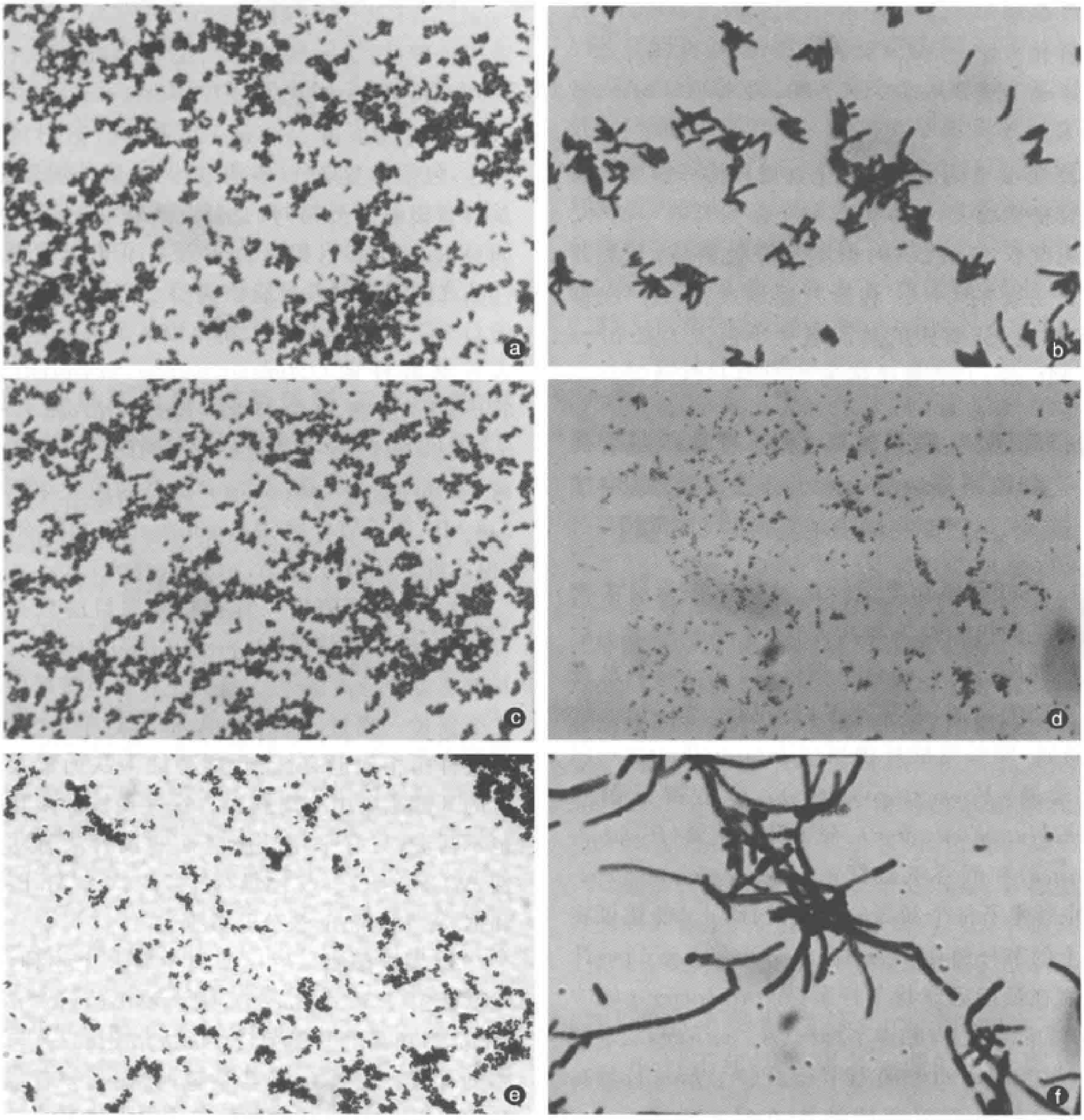


图 29-1 不同细菌的革兰染色形态

注:a. 白喉棒杆菌 ATCC14779 培养 48 h 后革兰染色形态;b. 耳炎苏黎士菌 DSM8821(48 h);c. 人皮杆菌 ATCC51325(48 h);d. 阴道加德纳菌 ATCC14018(48 h);e. 无枝菌酸棒杆菌 HC-NML 92-0507(24 h);f. 马特吕绍棒杆菌 ATCC14266(24 h),见彩插

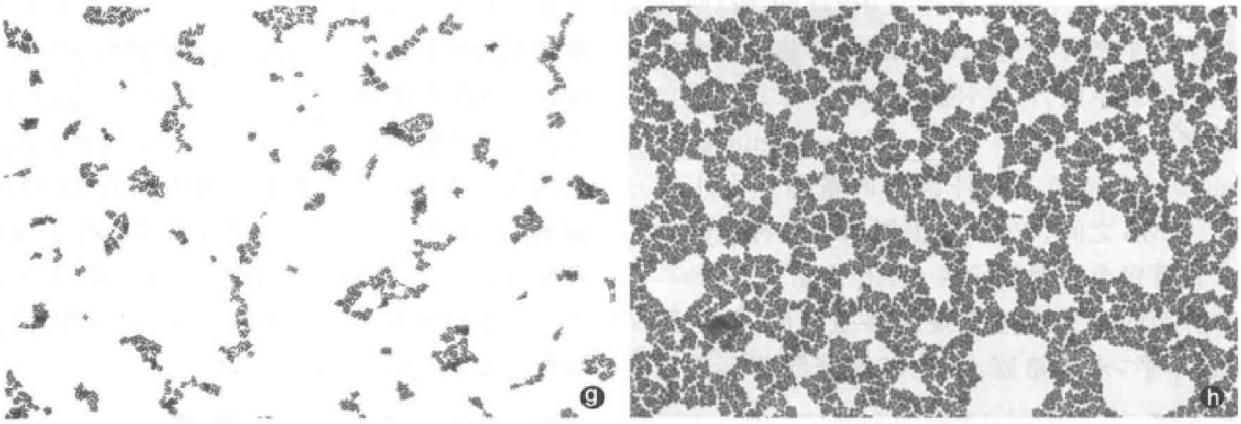


图 29-1(续)

注:g. 科伊尔棒杆菌 HC-NML 98-0068(24 h);h. 产黑色素龋齿罗氏菌 HC-NML 77-0298(24 h)

2. 苏黎士菌属 苏黎士菌属和棒杆菌属的系统发育密切相关,但耳炎苏黎士菌为其唯一的种。其细胞壁含有 m-DAP,但不含分枝菌酸,耳炎苏黎士菌主要的 CFAs 和棒杆菌属相同[16]。根据 WGS 测定,分离株的基因组大小范围为 2.07～2.15 Mb,G+C 含量范围为 71.2%～71.3%[17]。

(二)微球菌科[库克菌属、微球菌属和涅斯捷连科菌属(*Nesterenkonia*)在第 22 章中描述;不包括仅在环境中发现的 8 个属]

1. 节杆菌属和类节杆菌属 节杆菌属的物种是罕见的机会性人类病原体,自本手册上一版以来已经历了重大的分类学修改。Busse 对此进行了全面的回顾,并描述了以前属于节杆菌属的 5 个新属,即谷氨酸杆菌属(*Glutamicibacter*)、白芍杆菌属(*Paenarthrobacter*)、恋童癖杆菌属(*Paeniglutamicibacter*)、假关节杆菌属(*Pseudarthrobacter*)和假谷氨酸杆菌(*Pseudoglutamicibacter*),并概述了每个新属的具体特征[18]。他建议将狭义上的节杆菌属(*Arthrobacter sensu stricto*)严格限制在最接近球状节杆菌(*Arthrobacter globiformis*)的菌种,有帕森节杆菌(*A. pascens*)、米节杆菌(*A. oryzae*)和腐殖节杆菌(*A. humicola*)。出于教学目的,广义节杆菌属(*Arthrobacter sensu lato*)将继续包括这四个种,以及不容易分配给新属的其他 42 个物种。在该组中,有 4 个种,即体节杆菌(*A. luteolus*)、米节杆菌(*A. oryzae*)、血液节杆菌(*A. sanguinis*)和沃氏节杆菌(*A. woluwensis*)与人类疾病有关。这些属具有许多共性,包括革兰染色(棒状或球状)的外观变化,以及具有相似但不相同的细胞壁特性的氧化剂,例如,具有支链和饱和类型的 CFA,但在肽聚糖和极性肽之间观察到差异脂质类型。它们均具有较高的 G+C 含量,基因组大小范围从 3.4 Mb[迈索尔人谷氨酸杆菌(*Glutamicibacter mysorens*)]到 5.1 Mb[固氮白芍杆菌(*Paenarthrobacter nitroguajacolicus*)],并且各种不同的广义上的节杆菌(*Arthrobacter sensu lato*)的基因组大小范围从 3.8 Mb[沃氏节杆菌(*A. woluwensis*)]到 4.9 Mb[模式种球状节杆菌(*A. globiformis*)]。

2. 耳炎杆菌属 耳炎杆菌属目前只有一个种,即怠惰耳炎杆菌(*Auritidibacter ignavus*),从耳部感染中分离到[19]。目前正在研究该属中的第二个新种。通过 16S rRNA 基因测序,它与怠惰耳炎杆菌相似但有区别,这种细菌从加拿大和瑞士的耳部感染中分离获得。这些菌株的生化反应也不活泼,只有采用悬滴法而非试管法时动力阳性,WGS 的 G+C 含量为 59.5%(A. M. Bernier 和 K. A. Bernard,未公开数据)。

3. 罗氏菌属 罗氏菌属中有 8 个物种,其中气罗氏菌(*Rothia aeria*)、龋齿罗氏菌(*R. dentocariosa*)和黏滑罗氏菌(*R. mucilaginosa*)与人类感染有关。当使用革兰染色时,黏滑罗氏菌(*R. mucilaginosa*)(以前称为黏滑口腔球菌 *Stomatococcus mucilaginosus*[20])表现为球形,因此,在本书第 22 章中已有过描述(和其他触酶阳性、革兰阳性球菌)。龋齿罗氏菌主要表现但不仅仅表现为(图 29-1h)短或多形(非丝状)杆状形态,因此在本章中涵盖了棒状细菌。偶发的致病菌气罗氏菌主要具有

球或球菌的形态[21-22]。医学上相关物种的基因组大小范围从 2.2 Mb(黏滑罗氏菌)到 2.6 Mb(气罗氏菌),G+C 含量为 56%～59%。

(三)短杆菌科

短杆菌属 短杆菌属目前包括 32 种(到 2017 年 8 月为止),其中一些可以引起人类疾病,主要有:干酪短杆菌(*Brevibacterium casei*)、表皮短杆菌(*B. epidermidis*)、碘短杆菌(*B. iodinum*)、亚麻短杆菌(*B. linens*)、黄体短杆菌(*B. luteolum*)、麦氏短杆菌(*B. mcbrellneri*)、乌鸦短杆菌(*B. ravenspurgense*)、耳炎短杆菌(*B. otitidis*),少食短杆菌(*B. paucivorans*)和血短杆菌(*B. sanguinis*)。最近发现马赛短杆菌(*B. massiliense*)是乌鸦短杆菌的同义词,因此在乌鸦短杆菌中进行了描述[23]。修正后的来自乌鸦短杆菌的 WGS 数据表明,基因组大小为 2.28～2.41 Mb,G+C 含量为 62.3%～62.4%[23]。

(四)纤维单胞菌科(养障体属在第 69 章中描述,另外排除了 4 个来自环境的属)

1. 纤维单胞菌属 纤维单胞菌属目前包含 24 种,但从人类分离得到的只有人纤维单胞菌和丹佛纤维单胞菌[24-25]。马赛纤维单胞菌(*C. massiliensis*)从一位健康的塞内加尔人粪便标本分离到。根据 WGS 的测定,该物种的基因组大小为 3.41 Mb,G+C 含量为 71.2%[26-27]。

2. 厄氏菌属 厄氏菌属有 4 个种,肠友病厄氏菌(*Oerskovia enterophilia*)、詹内斯厄氏菌(*O. jenensis*)、保罗梅塔博拉厄氏菌(*O. paurometabola*)和狭义上的骚动厄氏菌(*O. turbata sensu stricto*)。这些细菌对人类的致病性在当今时代已经很难确定,因为在许多较旧的病例报告中,仅通过表型鉴定为骚动厄氏菌(*O. turbata*)或解黄嘌呤厄氏菌(*O. xanthineolytica*)的细菌,已被重新归类为芬氏纤维微菌[28]或纤维化纤维微菌[29]。与本章所述的其他属相比,该属的成员具有独特的特性,包括广泛的菌丝状结构,可以在表面或穿透到琼脂中(但不能在空中),然后分解为杆状单元[30]。骚动厄氏菌 NRRL-B8019^T 和肠友病厄氏菌 DSM 43852^T 的全基因组已经被测得,它们的基因组为 4.0～4.6 Mb,G+C 含量约为 72%。

(五)皮杆菌科(不包括来自爬行动物的属)

1. 皮杆菌属 皮杆菌属包含 3 个有效描述的物种,均来自临床标本。它们是人皮杆菌(*Dermabacter hominis*),可从多种临床标本中分离到[31];金雀皮杆菌(*D. jinjuensis*)来自手指伤口[32];阴道皮杆菌(*D. vaginalis*)分离自阴道分泌物[33]。后 2 个物种在 3 个月内相互描述,因此,它们的特征没有直接比较。通过对它们模式菌株的 16S rRNA 基因测序比较,发现它们彼此之间具有 99.1%的相似性,而与人皮杆菌有 98.5%的相似性。2016 年描述的物种在生化方面有许多相似之处,尽管由于使用不同的测试平台而难以直接比较它们,金雀皮杆菌对糖的反应性似乎不如人皮杆菌或阴道皮肤杆菌。一株多药耐药(MDR)人皮杆菌菌株的基因组大小为 2.51 Mb,G+C 含量为 62.95%[34],阴道皮杆菌菌株的基因组大小为 2.39 Mb,G+C 含量为 62.6%[35]。

2. 短状杆菌属和创伤杆菌属 短状杆菌属(*Brachybacterium*)有 19 个种,目前认为对人不致病。但是,符合该属的一些临床相关菌株已转交给加拿大国家微生物实验室[3 种来自血培养,最接近鼠李糖短状杆菌(*B. rhamnosus*)、鼠短状杆菌(*B. muris*)和副丛生短状杆菌(*B. paraconglomatum*);另一种来自腿部伤口,最接近雀巢短状杆菌(*B. nesternkovii*)(K. A. Bernard,未发表数据)]。Mages 等报道了从伤口上分离的一个分离物株,最接近丛生短状杆菌(*B. conglomeratum*)/副丛生短状杆菌(*B. paraconglomeratum*)[36]。WGS 显示这些物种的基因组大小为 3.0～4.19 Mb,其 G+C 含量为 70.7%～73.2%。

创伤杆菌属(*Helcobacillus*)是从患有皮肤红斑病的患者皮肤分泌物中分离的。这个属只有一个种,马赛创伤杆菌,G+C 含量为 68.6%[37]。

(六)原小单胞菌科(Promicromonosporaceae)(不包括分离自环境的 6 个属)

纤维微属 纤维微属(*Cellulosimicrobium*)目前包含 5 个种。其中 2 种与医学相关,纤维化纤维微菌和芬氏纤维微菌。纤维化纤维微菌,在过去被鉴定为纤维化纤维单胞菌或"有动力的"解黄嘌呤厄氏菌;它的目前描述还包括来自几个较老属和后来被认为是纤维化纤维微菌

的一些菌[29]。芬氏纤维微菌最初被错误地鉴定为骚动厄氏菌。从 WGS 分析得出的有关纤维化纤维微菌的毒力和其他因素的推论已经有所描述[38]。

(七)微杆菌科(Microbacteriaceae)(临床相关属)

1. 微杆菌属 目前,有 103 种有效命名的微杆菌属(*Microbacteriaceae*)细菌,其中只有少数与机会性临床感染有关。大多数菌种是环境、水或动物来源。在一项研究中,临床标本中最常分离的菌包括氧化微杆菌(*Microbacterium oxydans*)、副氧基微杆菌(*M. paraoxydans*)和叶片微杆菌(*M. foliorum*)[39];在加拿大的一份综述中也提及观察到了这 3 种菌及产左聚糖微杆菌(*M. laevaniformans*)[40]。近年来,许多微杆菌属的代表性菌株都已经进行了 WGS 分析。人微杆菌(*M. hominis*)(LCDC 84-0209T)基因组大小为 3.5 Mb,G+C 含量 71%,产左聚糖微杆菌(*M. laevaniformans*)(LCDC 91-0039)基因组大小为 3.0 Mb,G+C 含量 69.4%[41]。

2. 短小杆菌属 近年来,已有 5 种短小杆菌属(*Curtobacterium*)细菌被有效地描述,另有 6 种被重新划分为其他属。短小杆菌是不常分离的黄色或橙黄色色素氧化棒状细菌。人们认为它们引起局部感染,与脑脓肿和化脓性关节炎有关,来源于呼吸系统疾病患者的痰[42-44]。

3. 雷弗森菌属 迄今为止,雷弗森菌属(*Leifsonia*)已描述 11 种,除水生弗雷森菌外,所有其他菌种均从环境、植物或线虫中分离。该物种在临床标本中很少见,与机会性感染导致的败血症有关[45-46]。水生雷弗森菌的模式菌大小为 4.22 Mb,G+C 含量为 70.2%(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/22844)。

4. 其他很少引起人类疾病的属 农杆菌属(*Agromyces*)、犬杆菌属(*Canibacter*),白杆菌属(*Leucobacter*)和假棍状杆菌属(*Pseudoclavibacter*)

根据文献报道,农杆菌、犬杆菌、白杆菌和假棍状杆菌这 4 个属极少引起人类感染。农杆菌目前有 31 个种,均分离自土壤或水源。麦地农杆菌(*Agromyces mediolanus*)分离菌在 2 个病例报告中被认为与医学相关[47-48]。菌株细小,有短的分支或不规则杆状,随着菌龄的增长可呈球状。

口腔犬杆菌(*Canibacter oris*)是一种革兰阳性、触酶和氧化酶阴性的芽胞杆菌,从被犬咬伤患者的伤口分离到。该细菌在 API Coryne 和 API 20 Strep 中无反应,G+C 含量为 56.9%[49]。

假棍状杆菌在 2004 年首次被描述,当时被认为和模式菌株微黄短杆菌(*Brevibacterium helvolum*)相同。该属目前有 6 种在 LPSN 中被描述,但有人提出,它应该包括来自 Zimmermannella(译者注:该拉丁文没有中文名)属的菌种,如白色假棍状杆菌,双歧假棍状杆菌和粪假棍状杆菌(http://www.bacterio.net/zimmermannella.html)。一些以前的 *Zimmermannella* 属细菌与心内膜炎和菌血症有关[50-51]。经革兰染色,这些细菌为短或中等革兰阳性杆菌,双歧假棍状杆菌具有一些基本的分枝。G+C 含量为 67%。这些菌严格需氧,氧化酶和触酶阳性,无动力,白色或淡黄色菌落[52]。

(八)间孢囊菌科(临床相关属)

使用基于序列的鉴定方法对棒状细菌进行了医学相关属的鉴定,结果表明,以下 2 个属也可以从人类临床标本中分离到。

1. 两面神菌属 两面神菌属(*Janibacter*)的九种菌种中,越来越多的研究发现它们与临床感染有关[53-55]。这些菌株具有可变的革兰染色性,或呈革兰阳性,球状到棒状,呈单个、成对或不规则团块状。它们的 G+C 含量为 69%~73%。两面神菌不可运动,能产生白色、奶油色或淡黄色的色素。

2. 诺尔菌属 诺尔菌属有 5 个种,所有种都不引起人类疾病。但是该属中有一株细菌曾经被报道可从血培养中分离(Bernard,未发表数据)。细胞是不规则的革兰阳性棒或球形,G+C 含量为 68%~69%。诺尔菌血液培养分离株具有嗜酸性,在 37℃的 5%CO_2 中生长最佳。

(九)芽胞杆菌目(还未分类到科)

微小杆菌属(*Exiguobacterium*) 目前微小杆菌属包含有 16 个种,在这些里面,金橙黄微小杆菌,乙酰微小杆菌和西伯利亚微小杆菌(*E. sibiricum*)被报道可从临床标本分离到[56-57]。该属中的成员基因组中 G+C 含量为 46%~56%。

(十)放线菌科

放线杆状菌属(*Actinobaculum*),放线菌属(*Actinomyces*),*Actinotignum*(译者注:该拉丁文没有中文名),动弯杆菌属(*Mobiluncus*)和小弯菌属(*Varibaculum*)在第 54 章有描述。

隐秘杆菌属和储珀菌属　目前隐秘杆菌属(*Arcanobacterium*)包含 7 种菌,其中只有溶血隐秘杆菌在人类临床标本中被发现。已将其他和临床相关的隐秘杆菌属被重新分配为储珀菌属(*Trueperella*)(见下文)。长期以来,溶血隐秘杆菌一直被认为是引起咽炎的原因,尤其是在青少年中,也是尿道炎、脓肿、伤口感染、心内膜炎和菌血症的罕见病因[58-59]。利用 WGS 对该类型菌株进行分析,结果显示,模式菌种基因组大小为 2.0 Mb,G+C 含量 53.2%(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2134)。

储珀菌属由 5 个种组成,其中伯纳德储珀菌(*Trueperella bernardiae*)和化脓储珀菌(*Trueperella pyogenes*)可从人类标本中分离得到[60-62]。储珀菌属的一些细菌的 WGS 分析结果显示,模式菌种基因组大小为 2.03 Mb,G+C 含量 65.44%[63]。

三、流行病学与传播

许多棒杆菌是人类和哺乳动物的皮肤和黏膜微生物菌群的一部分。约 50 个棒杆菌属细菌与临床无关,分离自环境、食物或动物,并且不能以人畜共患的方式传播给人类。值得注意的是,并不是所有的棒杆菌均分布在皮肤和黏膜。其中许多占有特定的生态位,可引起机会性、局部性或全身性感染。白喉棒杆菌可以从鼻咽部及皮肤病变中分离,这实际上代表了白喉传播的一个储存部位。假结核棒杆菌感染主要通过处理受感染的动物而发生;白喉棒杆菌和溃疡棒杆菌与被感染的宠物或较大动物的接触有关,因此调查可能需要与兽医服务机构合作[64-65]。重要的机会致病菌甚至多重耐药菌(MDR)纹带棒杆菌(*C. striatum*)可从各种临床标本分离,除了眼部[1],该菌在健康志愿者的咽喉部中未发现[66]。杰氏棒杆菌和结核硬脂酸棒杆菌从人体无菌部位和伤口中分离时,是有临床意义的[1]。在口咽中发现的棒状细菌,无论有无感染,主要都包括坚硬棒杆菌和龋齿罗氏菌[66-67]。耳棒杆菌和耳炎苏黎世菌似乎偏好定植于外耳道[68]。麦氏棒杆菌从眼部分离的概率最高,但不仅限于眼部[69-71]。其他棒杆菌很少涉及眼部感染,包括劳氏棒杆菌(*C. lowii*)和眼棒杆菌(*C. oculi*)[12],丙酸棒杆菌(*C. propinquum*)[72]和牛棒杆菌(*C. bovis*)[73]。棒杆菌尿路偏爱的菌种有解脲棒杆菌(*C. urealyticum*)、金色黏液棒杆菌(*C. aurimucosum*)[1]和解谷氨酸棒杆菌(*C. glucuronolyticum*)[74-75]。一些物种已通过下一代测序方法检测到,但可能难以培养[76]。偶尔从肺炎病例的呼吸道标本中分离的菌种包括假白喉棒杆菌(*C. pseudodiphtheriticum*)、丙酸棒杆菌和纹带棒杆菌[4]。

隐秘杆菌的自然生长环境未被充分阐明,但溶血隐秘杆菌(*A. haemolyticum*)可从咽拭子及伤口拭子中分离而来,而伯纳德储珀菌主要是在邻近皮肤脓肿处发现[61-62,77]。化脓储珀菌的人类定植部位尚未阐明,但是在牛、羊和猪的黏膜中经常被发现。短杆菌可从临床标本分离,也可在乳制品(如奶酪)中分离,也可定植于人体皮肤表面[78]。节杆菌易于从土壤分离[18,79],但是卡氏节杆菌(*Arthrobacter cumminsii*)也可从人类皮肤分离到。耳炎杆菌属(*Auritidibacters*)已从耳标本中分离到[19]。微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、厄氏菌属(*Oerskovia*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*)和微杆菌属(*Microbacterium*)这几个属基本分离自环境(水、土壤等)。微杆菌属还可以从医院环境中分离[39]。短小杆菌属是主要的植物病原菌[80]。

四、临床意义

对临床标本中分离的棒杆菌进行临床意义的评估往往给临床微生物学家造成很大的困惑。部分原因是由于棒杆菌在人体皮肤表面和环境生长,一旦标本采集有误,这些菌就会被培养鉴定出来,但是和临床感染症状又不符合。

以下情况下棒状细菌应该鉴定到菌种水平:①从正常无菌部位标本分离到棒杆菌,如血标本(除非多份标本中只有一份阳性)、脑脊液标本等;②从正确采集的临床标本(深部伤口、

植入性假体等)中分离到棒杆菌,且其为优势菌群;③从尿标本中分离到棒杆菌,且其为唯一的细菌,细菌计数＞10^4/ml,或者棒杆菌是优势菌且细菌总量大于 10^5/ml;④棒杆菌属相关的肺炎,若是唯一分离或者优势分离的细菌,且临床症状相吻合[4]。如下情况下,棒状细菌的检出具有临床意义:①多份标本中检出同种棒杆菌;②革兰染色直接镜检观察到棒杆菌和强的白细胞反应;③从同一标本中分离到的其他微生物为低致病性。

有史以来,由白喉棒杆菌(或溃疡棒杆菌)引起的鼻咽部白喉是棒杆菌所致疾病中最突出的传染病。因此,本章需特别关注该传染病,而近期刚好有关于白喉的综述发表[81-82]。由于免疫接种计划的实施,该病在社会经济水平较高的国家已近消失。然而,这种疾病仍然在一些亚热带和热带国家,以及在某些种族(如在美洲和澳洲的土著人群)中流行[83]。在20世纪90年代,白喉在苏联的一些地区重新出现,但在随后的10年有所减少。然而,尽管全球旅游活动有所增加,在具有发达医疗保健系统的国家只有少数输入病例报道。

白喉的主要表现是上呼吸道感染伴发咽喉肿痛、吞咽困难、淋巴结炎、低热、乏力、头痛。该病的特征性表现是附着在鼻咽部的黏膜偶尔会导致呼吸道阻塞。白喉严重全身反应包括由白喉棒杆菌外毒素(由携带 *tox* 基因的噬菌体编码)引起的心肌炎、神经炎及肾损伤。白喉棒杆菌也可引起皮肤白喉或心内膜炎(毒素阳性菌株或毒素阴性菌株均可致病)。白喉棒杆菌易于在卫生条件较差的人群(如药物和酒精滥用者)中定植(皮肤往往多于咽部),这些人群很少发生非产毒素白喉棒杆菌菌株引起的严重的感染[84]。与难民有关的拥挤、不卫生的状况已成为白喉棒杆菌引起的表现为结节的皮肤感染的根源[85],并在新西兰[86]及瑞士和德国[87]发生过小规模暴发。在低免疫水平的地区,仍会发生由产毒素的白喉棒杆菌引起的暴发,导致很高的死亡率[88]。

五、标本的采集、运输和储存

一般来说,棒杆菌标本的采集不需要特殊处理。

白喉棒杆菌 白喉的诊断主要依赖于临床诊断,发现疑似白喉时医生应该立即通知接收标本的实验室。对于呼吸道白喉的病例,用棉或涤纶拭子擦拭炎症鼻咽部的区域以用于病菌培养。只有根据严格的标准(如第19章中所述的标准)取样时,方可接受棉签作为样本。鼻咽部的多点采样可能增加敏感性。如果有膜存在,并且是可移除的(膜下擦拭所得的拭子最有价值),其也应该被送到微生物实验室,但是,从感染患者那里获得的这些标本有时候仍可能是阴性的结果。尽管分离率较低,但仍应从可疑携带者那里获得鼻咽拭子进行培养[89]。最好在开始抗生素治疗之前收集标本,若已经开始使用抗生素,但如果使用基于PCR的方法检测毒素基因并鉴定病原体,则仍应收集标本进行检测[89]。拭子最好立即送到微生物实验室进行培养。如果拭子必须延迟送到实验室,半固体转运培养基(如 Amies)可保证细菌的存活。所有的棒杆菌对干燥及一般的温度变化都有相对的抵抗力。疑似白喉的患者伤口的标本可以通过拭子或穿刺获得。

所有棒杆菌可长期保存于－70℃的脱脂牛奶中。除了贮存有亲脂性的棒杆菌的脱脂牛奶培养管外,其余脱脂牛奶培养管都可反复冻融多次(G. Funke,数据未发表)。对于非亲脂性和亲脂性的棒杆菌,使用 Microbank 管可以观察到良好的结果(Pro Lab Diagnostics, Austin, TX)当将其冻干于适当的介质(如含2%牛血清白蛋白的0.9%氯化钠)中,棒杆菌也可存储数十年。

六、直接检查

接种到合适的分离培养基后(见以下"分离方法"),可对白喉假膜处采集的拭子进行奈瑟或吕氏亚甲蓝染色(如果出现异染颗粒则为阳性)。然而值得注意的是,显微镜检查的敏感性有限,这些方法现在并不常规检测。

白喉棒杆菌、溃疡棒杆菌和假结核棒杆菌是唯一的几种含有携带白喉毒素基因噬菌体且能产白喉毒素的菌种。已有文献报道基于PCR方法的直接检测系统用于检测白喉毒素基因,包括用常规方法检测片段A和(或)整个毒素基因[90],或检测毒素基因片段A和B的亚基[91]。

近年来已经有通过实时PCR检测毒素基因的报道[92-96]。在通过针对白喉棒杆菌 *tox* 基因定

制的引物进行修饰后，对溃疡棒杆菌毒素基因的检测也可提供很好的敏感性[93]。实时 PCR 法检测白喉棒杆菌、溃疡棒杆菌和假结核棒杆菌的 *tox* 基因已经在英国作为常规检测，这种检测方法是根据 De Zoysa 等的报道开发和评估的[96]。类似的方法由 Costa Torres 等描述[97]。使用检测白喉 *tox* 基因或白喉毒素阻遏基因 *dtxR* 作为临床标本的唯一检测方法是不推荐的，因为白喉毒素的表达必须得到证明，所以微生物学培养对于白喉的诊断很有必要[89]。

七、分离流程

关于从咽部分离白喉棒杆菌和溃疡棒杆菌的安全问题已经有概述[89,98]。常用的选择培养基尤其是针对产白喉毒素菌株的包括半胱氨酸亚碲酸盐血琼脂（CTBA；Thermo Scientific）、带羊血清的亚碲酸盐琼脂（BD Diagnostics）和 Tinsdale 琼脂（Thermo Scientific）[99]。棒杆菌包括白喉棒杆菌容易从含 100 μg/ml 磷霉素（加 12.5 μg/ml 葡糖-6-磷酸）的 5%绵羊血琼脂（SBA）选择性培养基上分离得到，因为几乎所有的棒杆菌（除放线菌和人皮杆菌外）对磷霉素高度耐药[100]。也可以把含 50 μg 磷霉素（加 50 μg 葡糖-6-磷酸盐）的纸片放在 SBA 或多黏菌素-萘啶酸（CNA）平板上，然后检测纸片周围生长的菌落。也有文献报道含 50～100 μg/ml 的呋喃唑酮的平板作为棒杆菌的选择性培养基。若要筛选杰氏棒杆菌和解脲棒杆菌之类的亲脂性棒杆菌，则需要在 SBA 平板上添加 0.1%～1% 吐温 80（倾倒培养基之前添加吐温 80）。亲脂性的其他方法介绍如下。迄今发现的医学相关棒杆菌均不在麦康凯琼脂上生长。然而，如果“棒状”细菌在麦康凯培养基中生长，则应仔细检查以排除快速生长分枝杆菌。

除了极少数例外（某些节杆菌、细杆菌和短状杆菌最佳生长温度在 30～35℃之间），医学相关的棒杆菌均在 37℃生长。培养棒杆菌的标本适宜在富含 CO_2 的环境中培养，因为一些类群，如罗氏菌属、隐秘杆菌属和储珀菌属（*Trueperella*），在这样的条件下长得更好。几乎所有的医学相关的棒状细菌在 48 h 内均会生长形成菌落，所以原始平板不应培养超过 48 h。然而，如果使用液体培养基（如从正常无菌部位采集的标本），应在 5 天后检查浑浊度，如果浑浊，革兰染色检查是否存在棒杆菌后方可被丢弃（除非出现肉眼可见的生长）。

建议将尿标本孵育 24 h 以上，以检查是否存在与尿路感染有关的生长较慢的棒杆菌属细菌：解脲棒杆菌、快速解脲棒杆菌、解谷氨酸棒杆菌、金色黏液棒杆菌和其他；患者一般都会有症状，如高龄、有导尿管或其他异物、尿呈碱性、尿沉渣中有结晶，或曾做过泌尿生殖道外科手术[1]。

白喉棒杆菌、溃疡棒杆菌和假结核棒杆菌 Amies 等培养基可以作为白喉棒杆菌、溃疡棒杆菌和假结核棒杆菌的转运培养基。若条件有限，用硅胶作为转运培养基，干燥的棉签需要在（补充血浆或全血的）肉汤培养基中过夜孵育，再划线接种至初始培养基上。平板置于 37℃温箱中孵育 18～24 h，最好给予 5%的 CO_2。

用于培养产白喉毒素菌株的初始培养基应包括 SBA 加一种选择性培养基（如胱氨酸亚碲酸钾血琼脂 CTBA 或新鲜配制的 Tinsdale 培养基）[89,101]。在这些培养基中添加亚碲酸盐抑制许多非棒杆菌的生长，特别是在呼吸道标本中发现的细菌。一些白喉棒杆菌分离株对亚碲酸钾敏感，因此可能不在 CTBA 上生长，但在 SBA 上生长。直接培养白喉棒杆菌的最佳培养基可能是 Tinsdale 培养基[61]。然而，Tinsdale 培养基保质期比较短（<4 周）且需添加马血清，使其应用受限。Tinsdale 平板可反映亚碲酸盐还原酶活性（菌落呈黑色）和胱氨酸酶活性（菌落周围可以观察到棕色环）（图 29-4i）。当没有 CTBA 和 Tinsdale 培养基时，推荐使用 CNA 平板用来分离白喉棒杆菌或其他棒杆菌。其他棒杆菌在 Tinsdale 培养基上可能会生长并产生棕褐色至黑色（尽管较小）的菌落，但这些菌种在每个菌落周围都缺乏独特的光环。为分离得到白喉棒杆菌，有必要从 CNA 板上挑取多个菌落。由于其他细菌过度生长，非选择性吕氏血清斜面培养基不再推荐用于白喉棒杆菌的初步分离。图 29-2 中提供了用于处理这些菌种的固相材料的建议算法。在美国疾病预防与控制中心（CDC）网站（https://www.cdc.gov/diphtheria/downloads/dip-collection.pdf）可以找到样品运输和菌株分离的指南。

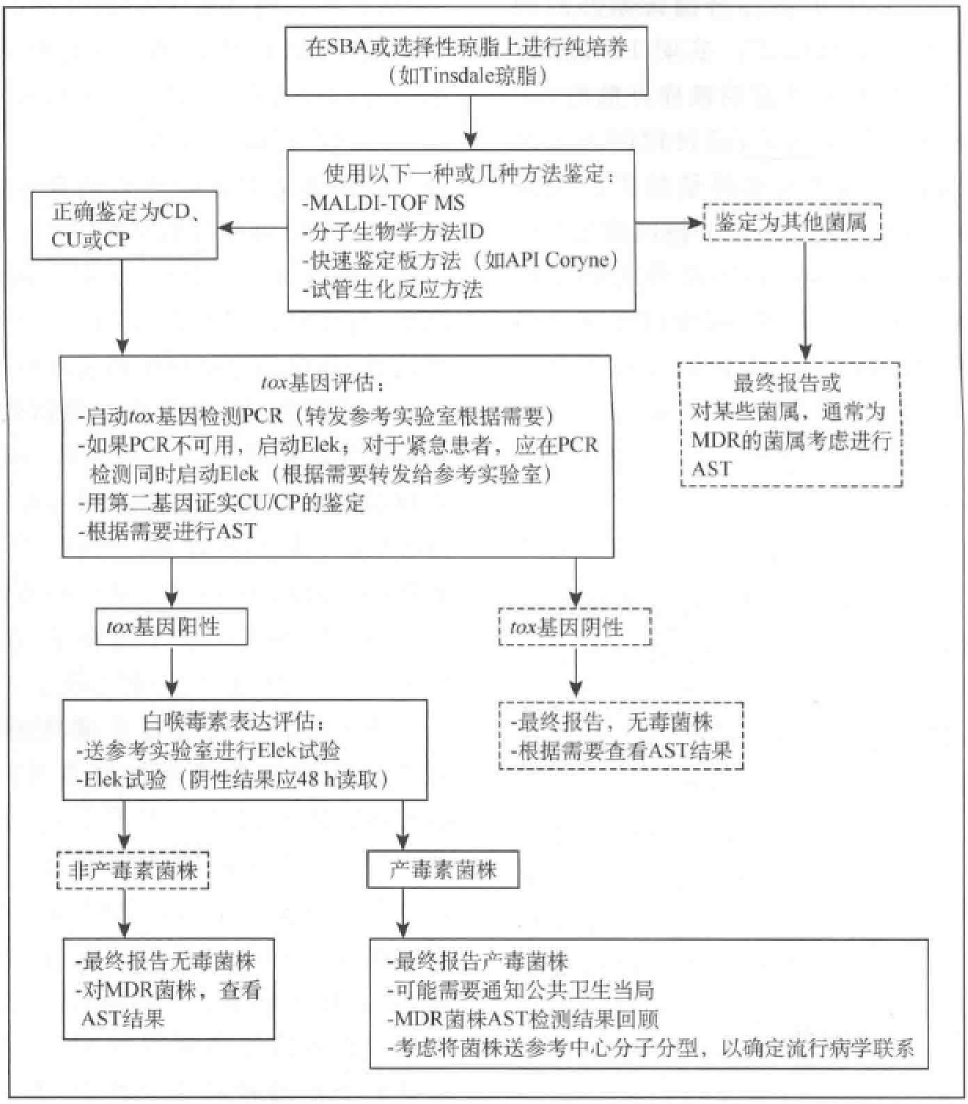


图 29-2 用于处理怀疑可能是产生白喉毒素的物种（白喉棒杆菌、溃疡棒杆菌和假结核棒杆菌）的算法。PCR 阳性但 Elek 阴性的菌株据报道是无毒的。不需要鉴定到生物型水平[145]，但通常会在报告中提供结果（来自生化鉴定）。假结核棒杆菌通常与患病动物的接触有关；白喉棒杆菌和溃疡棒杆菌也可以通过人畜共患传播，因此，公共卫生对策可能需要兽医帮助。另请参阅参考资料[89]

八、鉴定

(一)菌属和菌种的分类

每个微生物实验室均可提供的基本检测对于棒杆菌的鉴定具有重要价值。细胞革兰染色的形态可以排除属于许多属的可能，甚至也可以引导人们将细菌划分到正确的属（图 29-1）。同样，尽管非常罕见，但对肺炎患者的痰进行革兰染色后，革兰阳性棒杆菌的观察和其他菌群的观察可能提供有用的诊断信息。基本信息，例如，菌落的形态、大小、颜色、气味和溶血性，对棒杆菌的鉴别诊断也是有价值的。

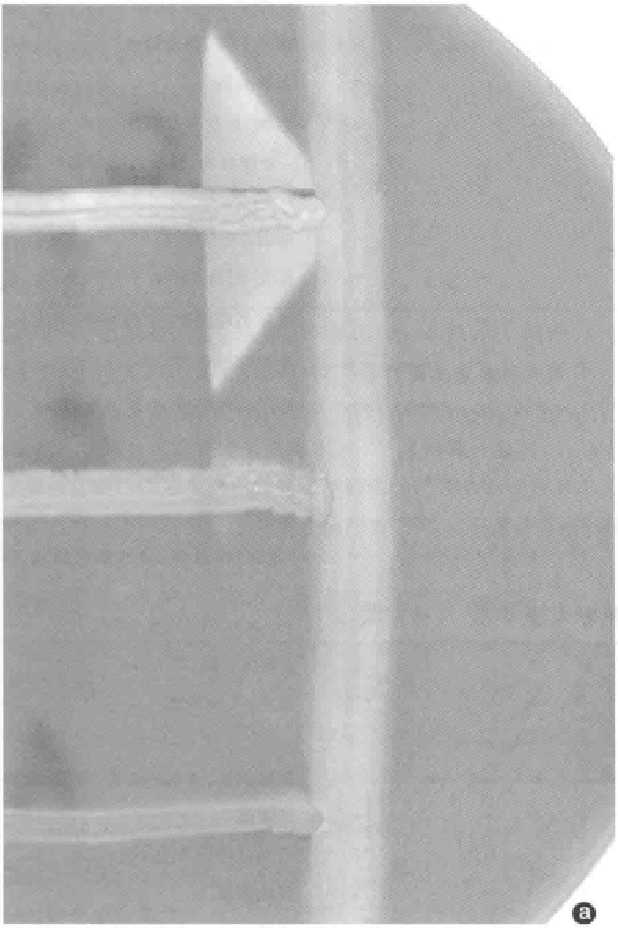
现在，许多实验室都使用 MALDI-TOF MS 系统来准确、快速且经济高效地识别常见的医学相关棒杆菌。较大的实验中心使用分子方法（如 16S rRNA 基因测序）来鉴定或证实，该方法通常提供明确的属级鉴定，通常还可以进行种级鉴定（第 7 章）。下面还针对这 2 种方法对此处描述的各种属和种的鉴定进行了具体的描述，尽管很少有出版物描述使用 MALDI-TOF MS 技术用于某些罕见的棒杆菌的鉴定。

有些实验室无法使用这些技术，因此，这里简要回顾了表型鉴定的方法。单独通过表型检测的

方法进行鉴定，可能对某些常见的棒杆菌属和种是准确的，如纹带棒杆菌和白喉棒杆菌。但是，这种方法可能无法明确地识别该属中的所有物种，即使对于此处描述的许多稀有棒杆菌的属的识别也没有多大用处。表型测试方法将提供模棱两可的识别，尤其是对于在常用测试平台中与底物不反应的一些菌属和种。因此，如果需要对临床相关棒杆菌进行明确鉴定，实验室应通过转诊至使用 MALDI-TOF MS 技术或基于序列的鉴定方法的参考中心来确证这些鉴定。

(二)生化试验

1. 试管法生化试验　在 20 世纪 80 年代初期，提出了基于生化结果的棒杆菌鉴定方法和鉴定流程[102]。目前这些方法仍在使用，如用于新物种描述[12]或由缺乏分子或快速鉴定系统的较小中心使用。von Graevenitz 和 Funke[103]也概述了一种改进的生化鉴定方案。这一方案建议包括以下反应：触酶；发酵或氧化试验；动力；硝酸盐还原反应；尿素分解反应；七叶苷水解反应（培养 48 h）；葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、甘露糖和木糖产酸反应（培养 48 h）；CAMP 反应（培养 24 h）（第 20 章）（图 29-3a）；亲脂性试验（培养 24 h），该试验仅针对直径<0.5 mm 且触酶阳性的菌落。建议进行氧化酶检测。尽管在本章前面的版本[8]中引用了对 O129 平板、DNA 酶、酪蛋白、淀粉、酪氨酸、马尿酸盐和其他水解测试的使用，但此处不作进一步描述。可以通过 2 种方法进行亲脂性试验：①菌落接种至普通 SBA 和含有 0.1%～1.0%吐温 80 的SBA平板。亲脂性棒杆菌在含吐温的琼脂培养



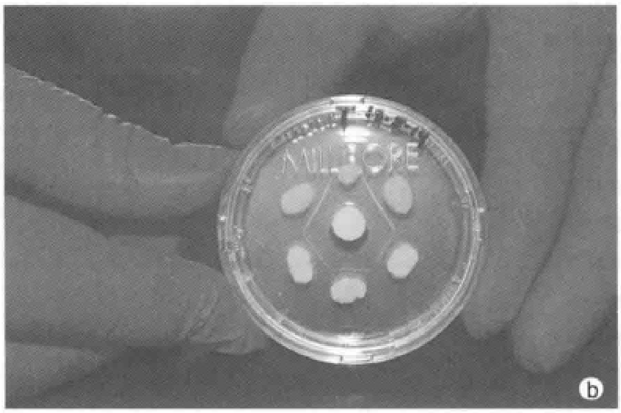


图 29-3　a. 24 h 后的 CAMP 反应。最上为解谷氨酸棒杆菌 DMMZ 891（阳性反应）；中间为白喉棒杆菌 ATCC14779（阴性反应）；最下为溶血棒杆菌 ATCC9345ᵀ（CAMP 抑制反应）；垂直的划线是金黄色葡萄球菌 ATCC25923。b. 48 h 后的 Elek 反应。顺时针方向从上开始：干燥棒杆菌 ATCC 373ᵀ，阴性对照；白喉棒杆菌 ATCC 27012（C7s 菌株），产生大量毒素，强阳性；临床分离菌株溃疡棒杆菌 NML 130346；白喉棒杆菌 ATCC 19409（5NCTC 3984），产生少量毒素，弱阳性；临床分离株的重复；强阳性的重复。中间含有白喉抗毒素。当毒株产生的毒素和白喉抗毒素反应时，它们在琼脂中间形成一个可见的沉淀线。阴性对照无沉淀线。一些强毒素在 24 h 或之前呈阳性，而弱毒素通常在 48 h 才呈阳性。孵育长达 72 h，可以从视觉上增强沉淀线。非产毒素菌株在 48～72 h 内未见沉淀线，见彩插

24 h后菌落直径达到2 mm。②细菌接种至含有和不含有1%vol/vol无菌吐温80的脑心浸出液肉汤中，对生长状况进行比较，只在含有吐温80的肉汤中生长的菌才能称为亲脂。表29-2和表29-3分别列出了与医学相关的棒杆菌属和其他革兰阳性棒杆菌的鉴定方案。

表29-2 医学相关棒杆菌[a]的鉴定

菌种	氧化/发酵	亲脂性	硝酸盐还原	脲酶	七叶苷分解	吡嗪酰胺酶	碱性磷酸酶	产酸					CAMP试验	备注
								葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	甘露醇	木糖		
拥挤棒杆菌	F	+	+	−	−	V	−	+	−	V	V	−	−	
非发酵棒杆菌非发酵亚种	O	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	V	常MDR
非发酵棒杆菌嗜脂亚种	O	+	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	V	
无枝菌酸棒杆菌	F	−	V	V	−	+	+	+	V	V	−	−	−	菌落可呈干燥、蜡样，通常MDR
阑尾炎棒杆菌	F	+	−	+	−	+	+	+	+	−	−	−	ND	
畏水棒杆菌	O	+	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−	
银堡棒杆菌	F	−	−	−	−	+	V	+	−	−	−	−	−	糜蛋白酶可阳性
非典型棒杆菌	F	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	ND	β-葡糖苷酶可阳性
金色黏液棒杆菌	F	−	−	−	V	+	+	+	+	+	−	−	ND	一些菌株黄色，罕见灰黑色，或菌落下陷生长/呈MDR
耳棒杆菌	O	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	菌落干燥，黏附琼脂
犬耳棒杆菌 *C. auriscanis*	O	−	−	−	V	−	+	+	−	−	−	−	−	犬相关的
牛棒杆菌[b]	F	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	果糖、氧化酶可阳性
犬棒杆菌	F	−	−	+	−	+	+	+	+	+	−	−	−	α-葡糖苷酶、胰蛋白酶可阳性
混淆棒杆菌	F	−	+	−	−	+	+	(+)	−	−	−	−	−	
科伊尔棒杆菌	F	−	−	−	−	+	+	(+)	−	−	−	−	+	可以MDR
棒杆菌CDC F-1群	F	+	V	+	−	+	−	+	+	+	−	−	−	见正文，可MDR
白喉棒杆菌重型[c,d]	F	−	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	糖原利用阳性、个别菌株MDR
白喉棒杆菌中间型[c,d]	F	+	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	糖原利用可变
白喉棒杆菌轻型[c,d]/贝尔凡蒂型[e]	F	−	+/−[e]	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	糖原利用阴性、个别菌株MDR
坚硬棒杆菌	F	−	+	(V)	(V)	+	−	+	+	+	V	−	−	黏附琼脂，半乳糖阳性
斐氏棒杆菌	F	−	−	(+)	−	(+)	+	(+)	V	−	−	−	−	黄色菌落
弗赖堡棒杆菌	F	−	+	−	+	−	ND	+	+	+	−	−	−	"轮辐"样菌落，强力黏附琼脂，与犬相关
弗雷尼棒杆菌	F	−	V	−	−	+	+	+	+	+	−	−	ND	20～42℃生长，可MDR
解谷氨酸棒杆菌	F	−	V	V	V	+	V	+	V	+	−	V	+	β-葡糖苷酶、可MDR
汉森棒杆菌	F	−	−	−	−	+	−	+	+	+	−	−	ND	黄色，干燥菌落
模拟棒杆菌	F	−	−	−	−	(+)	+	+	+	(+)	−	−	+	
杰氏棒杆菌	O	+	−	−	−	+	+	+	V	−	−	−	−	果糖阴性，厌氧不生长，常为MDR
克氏棒杆菌	F	+	−	−	+	+	−	+	V	+	−	−	−	苛养菌
库奇棒杆菌 *C. kutscheri*	F	−	+	+	−	+	−	+	+	+	ND	−	ND	与老鼠咬伤有关
嗜脂黄色棒杆菌	(F)	+/−	−	(+)	−	+	+	(+)	−	−	−	−	V	黄色菌落
劳氏棒杆菌 *C. lowii*	F	+	−	+	−	−	+	V	V	V	−	−	−	果糖可变，α-葡糖苷酶阴性
麦氏棒杆菌	F	+	+	−	−	−	+	+	−	+	V	−	−	
马赛棒杆菌	F	−	−	−	−	(+)	(+)	−	−	−	−	−	ND	
马氏棒杆菌	F	−	+	−	V	+	−	+	+	+	−	−	−	菌体"鞭柄"样(革兰染色)，半乳糖阴性
极小棒杆菌	F	−	−	−	−	+	+	+	+	V	V	−	−	
产黏棒杆菌	O	−	−	−	−	+	+	+	−	V	−	−	−	非常粘的黄色菌落
眼棒杆菌	F	+	−	+	−	−	+	+	V	V	−	−	−	果糖和α-葡糖苷酶阳性

（续　表）

菌种	氧化/发酵	亲脂性	硝酸盐还原	脲酶	七叶苷分解	吡嗪酰胺酶	碱性磷酸酶	产酸					CAMP试验	备注
								葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	甘露醇	木糖		
皮尔巴拉棒杆菌	F	−	−	−	−	+	+	+	−	+	−	−	ND	可 MDR
丙酸棒杆菌	O	−	+	V	−	V	V	−	−	−	−	−	−	可 MDR
假白喉棒杆菌	O	−	+	+	−	+	V	−	−	−	−	−	−	可 MDR
假结核棒杆菌[d]	F	−	V	+	−	−	V	+	+	V	−	−	REV	
丙酮酸棒杆菌	F	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	β-葡糖苷酶、可 MDR
多耐棒杆菌	F	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	厌氧环境生长缓慢，MDR
里格尔棒杆菌	F	−	−	+	−	V	V	−	(+)	−	−	−	−	
模仿棒杆菌[f]	F	−	+	−	−	V	+	+	−	+	−	−	−	亚硝酸盐降解，可 MDR
独特棒杆菌	F	−	−	+	−	+	+	+	+	+	−	−	−	
痰棒杆菌	F	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−	ND	α-葡糖苷酶
固态棒杆菌	F	−	+	+	−	(+)	−	(+)	−	−	−	−	−	枸橼酸盐产碱
纹带棒杆菌	F	−	+	−	−	+	+	+	−	V	−	−	V	常 MDR
松兹瓦尔棒杆菌	F	−	−	+	−	V	V	+	+	+	−	−	−	黏性菌落
梢氏棒杆菌	F	−	−	+	−	+	+	+	+	+	−	−	−	N-乙酰-β-氨基葡萄糖苷酶阳性，黏性菌落
蒂莫棒杆菌	F	−	−	−	(+)	+	+	+	−	−	−	−	ND	黄色菌落
结核硬脂酸棒杆菌	F	+	V	−	−	+	V	+	V	V	−	−	−	发酵果糖、厌氧生长、MDR
图斯卡尼亚棒杆菌	O	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−	−	−	
溃疡棒杆菌[d]	F	−	−	+	−	−	+	+	+	−	−	−	REV	可能与宠物感染有关
解脲棒杆菌	O	+	−	+	−	+	V	−	−	−	−	−	−	常 MDR
快速解脲棒杆菌	F	+	−	+	−	+	+	+	−	−	−	(+)	ND	快速脲酶强阳性，可 MDR
干燥棒杆菌	F	−	V	−	−	+	+	+	+	+	−	−	−	可 MDR

注：[a]MDR. 重耐药[40]F. 发酵；O. 氧化；+. 阳性；−. 阴性；V. 可变；(). 反应延迟或较弱；ND. 无数据；REV. CAMP 抑制反应(同时可参考文献[2][4][5][8]和[136])。[b] 牛棒杆菌血液培养分离菌[136]的邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷呈阳性，氧化酶呈阳性，麦芽糖呈弱阳性，但 API Coryne 呈阴性。使用 2 种方法(API Coryne 和 API ZYM)未观察到 β-半乳糖苷酶。获得的 API Coryne 代码为 0101104。[c] 南美洲的一些白喉棒杆菌被描述为蔗糖发酵[148]。[d] 菌株应进行 *tox* 基因检测，如果阳性，应进行 Elek 检测。[e] 白喉棒杆菌轻型硝酸盐还原酶阳性，白喉棒杆菌贝尔凡蒂型硝酸盐还原酶阴性。[f] 模仿白喉棒杆菌在高浓度及低浓度都是强亚硝酸盐还原剂；除非使用锌粉做进一步试验，则可能出现硝酸盐还原试验呈阴性的结果[209]；一个菌株呈触酶阴性[136]。

表 29-3　医学相关棒杆菌属外的棒杆菌鉴定[a]

菌种	过氧化氢酶	O/F	动力	硝酸盐还原	脲酶	七叶苷分解	产酸					备注
							葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	甘露醇	木糖	
棒杆菌科												
耳炎苏黎世菌	+	O	−	−	−	−	−	−	−	−	−	长杆状，CAMP 试验阳性
微球菌科												
节杆菌属及相近菌属	+	O	V	V	V	V	V	V	V	−	−	
怠惰耳炎杆菌	+	O	+	−	−	−	−	−	−	−	−	
龋齿罗氏菌	V	F	−	+	−	+	+	+	+	−	−	部分菌株菌落黏，产灰黑色色素；空间罗氏菌生化反应与齿龈罗氏菌类似
短杆菌科												
短杆菌属	+	O	−	V	−	−	V	V	V	−	−	

（续 表）

菌种	过氧化氢酶	O/F	动力	硝酸盐还原	脲酶	七叶苷分解	产酸					备注
							葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	甘露醇	木糖	
纤维单胞菌科												
纤维单胞菌属	+	F	V	+	−	+	+	+	+	V	+	
骚动厄氏菌	+	F	V	+	−	+	+	+	+	−	+	可呈现假菌丝(图 29-4)
皮杆菌科												
人皮杆菌	+	F	−	−	−	+	+	+	+	−	V	小杆状可发酵木糖
马赛创伤杆菌(*Helcobacillus massiliense*)	+	F	−	+	−	−	+	+	+	+	+	
原小单胞菌科												
纤维微菌属	+	F	V	V	V	+	+	+	+	−	+	
微杆菌科												
微杆菌属	V	F/O	V	V	V	V	+	+	V	V	V	
短小杆菌属	+	O	V	−	−	+	+	V	V	V	+	
水生雷弗森菌	+	O	+	V	−	V	+	V	V	+	+	
芽胞杆菌目(还未分类到科)												
乙酰微小杆菌	+	F	+	V	−	+	+	+	+	+	−	产金黄色色素
放线菌科												
溶血隐秘杆菌	−	F	−	−	−	−	+	+	V	−	−	CAMP 试验抑制
伯纳德储珀菌	−	F	−	−	−	−	+	+	−	−	−	糖原阳性
化脓储珀菌	−	F	−	−	−	V	+	V	V	V	+	
双歧杆菌科												
阴道加德纳菌	−	F	−	−	−	−	+	+	V	−	−	革兰染色易脱色

注：[a] 此处列出的许多菌可能会产生黄色或淡黄色的色素。简写和符号：F. 发酵；O. 氧化反应；F/O. 发酵或氧化；+. 阳性反应；−. 阴性反应；V. 可变。另见参考文献[52][59][78-80][246][249][250][252][256-258]和[270]

2. 鉴定试条法和 CFA 成分分析法 广泛使用的手工鉴定方法包括 API 棒杆菌鉴定系统、RapID CB Plus 系统和 BBL Crystal 革兰阳性菌鉴定系统，这些鉴定方法已经至少使用了 20 年。API 棒杆菌鉴定系统的鉴定结果，与在线数据库 API WEB 相比较（https://apiweb.biomerieux.com）即可得出；这个系统可以正确鉴定出白喉棒杆菌（Bernard，未发表数据）。使用手动鉴定法的注意事项包括：①近年来尚未有对这些产品的评估报告发表；②基础数据库不经常更新；③结果的可重复性取决于遵循制造商的建议。关于无法准确识别的其他注意事项也已进行了综述[4]。Vitek 2 平台[104]在革兰阳性菌中的鉴定也已经被广泛使用，但是由于其数据库有限，很难正确识别到种水平。严格确认任何商业系统提供的鉴定结果，并将结果与基本特征（如形态和革兰染色结果）相关联，始终是非常重要的。

参考实验室也可以使用色谱分析技术对棒杆菌进一步表征，如使用 Sherlock 系统（http://www.midilabs.com/fatty-acid-analysis）的气-液相色谱法对 CFA 进行分析，已经在 CFA 的多相表征中发挥关键作用，棒杆菌属和相关新属、新种的描述，但只能由精通此类测定的参考实验室来完成。现在这种方法很少在临床微生物学实验室中常规进行。

（三）MALDI-TOF MS 系统

大量研究表明，MALDI-TOF MS 法能够可靠地鉴定出 90%的与医学相关的棒杆菌属的细菌到种水平，但鉴定其他棒杆菌的准确率较低[105-111]。正如在其他自动识别系统中发现的那样，与 16S rRNA 基因测序密切相关的物种（99%以上同源性）也可能很难通过 MALDI-TOF MS 法进行识别。例如，假白喉棒杆菌可能被识别为丙酸棒杆菌，或者 2 个物种的得分可能相似并且都具有很高的置信度[108,112]。Leal 等发现使用 Vitek MS 质谱仪很难将无枝菌酸棒杆菌和干燥棒杆菌区分开来[1]。大多数研究表明，提高布鲁

克(Bruker)和 Vitek MS 平台正确识别这些稀有菌种(相对于基于序列的方法进行识别)的能力的唯一建议是,制造商加强商业化的 MALDI-TOF MS 数据库;其中包括当前被遗漏或代表性不足的病原体的数量。这里描述的许多稀有菌种仅由少量(0 或 1)图谱可用。但是,通过 MALDI-TOF MS 方法鉴定的准确性似乎提高了在当地医院对某些罕见病原体的准确识别水平。质谱图可被用来描述新型棒杆菌特征,独特的 MALDI-TOF MS 质谱图会提高"不可靠的鉴定"(布鲁克评分)[12]。MALDI-TOF MS 系统可以有效地鉴定白喉棒杆菌[105]。在加拿大,检测从特定患者人群中采样的深创伤口、各种体液及耳和眼部感染样本,导致可识别为白喉棒杆菌和溃疡棒杆菌的细菌分离率意外增加。这导致对 PCR 检测 *tox* 基因的需求激增,随后对 PCR 阳性分离株进行 Elek 分析(Bernard,未发表数据)。Forbes 对公共卫生和治疗反应的综述中描述了在高免疫接种率人群中可分离到白喉棒杆菌[113]。

可以尝试使用 MALDI-TOF MS 法直接从阳性血培养瓶中鉴定棒杆菌属和其他棒杆菌,之前可使用裂解法或涂板法处理标本。但是这些方法会产生额外的成本和时间,而且与革兰阳性菌的 MALDI-TOF MS 识别图谱匹配效果差于预期[114]。

(四)使用单个或多个基因靶标的测序鉴定方法

基于序列的鉴定可用于本章中描述的所有棒杆菌的明确分类学研究,包括仅通过生化反应无法明确鉴定,或 MALDI-TOF MS 法无法可靠地鉴定或高置信的种超过 2 个以上。本书第 17 章和第 18 章提供了其他分子鉴定选择。

确定完整或接近完整的 16S rRNA 基因序列是鉴定棒杆菌属的一种合理方法,因为大多数已建立的物种彼此之间表现出 3%或更大的差异,除了非发酵棒杆菌、科伊尔棒杆菌和产黏棒杆菌(<2%);金色黏液棒杆菌、极小棒杆菌和独特棒杆菌(<2%);松兹瓦尔棒杆菌和梢氏棒杆菌(<1.5%);溃疡棒杆菌和假结核棒杆菌(两者间<1%,和白喉棒杆菌比<2%);接近棒杆菌和假白喉棒杆菌(<2%);干燥棒杆菌,弗雷尼棒杆菌和汉森棒杆菌(<2%);麦金利棒杆菌和拥挤棒杆菌(<2%)[4]。对于 16S rRNA 测序无法鉴定的棒杆菌,可通过 *rpoB* 基因片段测序(使用命名为 C2700F 和 C3130R 的引物)来解决,因为该基因的这一特定区域在棒杆菌属细菌中显示出高度的多态性[115-116]。2 个菌株 *rpoB* 基因这一特定部分的差异>5%,表明它们属于 2 个不同的种。

16S rRNA 基因测序被优先推荐用于微杆菌属的鉴定。但是,该属中的许多种彼此具有 99%的相似性,例如:金微杆菌(*M. aurum*)、湖泊微杆菌(*M. lacus*)和 *M. aoyamense*(译者注:该拉丁文没有中文名);或叶片微杆菌(*M. foliorum*)和叶球形微杆菌(*M. phyllosphaerae*)[40],迄今为止,尚未有标准化的其他基因靶标可采用。同样,这些稀有的棒杆菌也因多年来研究不足,导致分类学上的空白。总而言之,基于序列的方法可以提供确定的鉴定,但是应由在这些测定和解释方面具有公信力的专业实验室进行。

(五)WGS 作为鉴定工具,提供了其他信息

WGS 的常规使用(第 18 章)尚处于初期阶段,但自本手册上一版以来,发展非常迅速。如前所述,大多数棒杆菌属物种的草图或全基因组,以及此处介绍的其他棒杆菌的独特菌株,都已放入 NCBI 的公共数据库中。近年来,WGS 分析的成本大大降低了,在不久的将来可以证明它是分类的一种有吸引力的方法,将鉴定、菌株分型、抗性基因和毒力因子的检测结合在一起。已经描述了基因组中是否存在关键基因,例如与脂肪酸生物合成有关的基因(棒杆菌的亲脂物种中不存在)[117],分枝菌酸酯的生物合成(存在于大多数棒杆菌细胞壁中)[14]和独特金色黏液棒杆菌中的黑色色素的产生[118]已经被描述。WGS 被用作分类学工具,已经明确证明马赛短杆菌是后来的乌鸦短杆菌的同义词[23]。在同行评审的出版物中或在 NCBI 基因组数据库中可找到的的模式菌株或其他特征明确的分离株的 WGS,以及暴发流行相关的模式菌株,或菌株毒力因子的研究,将在下文介绍。

九、鉴定:属和种的说明

与该属细菌相关的感染列于表 29-1;有些详细信息在下文各个菌种的单独描述中也会提到。表 29-2 列举了与人类疾病相关的棒杆菌基于表型

试验的鉴定流程,这些菌种在下文同样会有具体描述。文中或表 29-2 中所描述的棒杆菌,除了亲脂性的,其他均是在最适培养温度下标准培养基中培养 24 h 后获得的培养结果。

(一)棒杆菌科

1. 棒杆菌属

(1)拥挤棒杆菌(*C. accolens*):拥挤棒杆菌[119]分离自眼、耳、鼻和口咽部。它是从无症状的老年人的鼻咽中发现的最常见的棒杆菌[120]。由该菌引起的主动脉和二尖瓣心内膜炎已有详述。菌落同其他亲脂性棒杆菌一样,凸面,光滑,SBA 上的直径<0.5 mm。它可以发酵代谢,吡嗪酰胺酶反应可变但碱性磷酸酶阴性,从而区分于结核硬脂酸棒菌。MALDI-TOF MS、API Coryne 和 RapID CB Plus 系统应能正确鉴定拥挤棒杆菌。拥挤棒杆菌是广谱抗菌药物敏感的菌株,除非该菌株含有 *ermX* 基因,导致对红霉素和克林霉素产生耐药性[40]。

(2)非发酵棒杆菌非发酵亚种(*C. afermentans* subsp. *afermentans*):非发酵棒杆菌非发酵亚种[121]是人类皮肤微生物群的一部分,目前为止主要分离自血培养和脓肿物。培养 24 h 后菌落呈白色,边缘光滑凸起状,黏稠,直径为 1.0~1.5 mm,有氧代谢。API Coryne 系统对该种提供的数字代码是 2100004。该类群所有细菌中大约 60%的菌株 CAMP 反应阳性。根据菌落的黏度(耳棒杆菌对琼脂轻度黏附)和革兰染色形态(耳炎苏黎士菌的细胞更长)可以将非发酵棒杆菌非发酵亚种从耳棒杆菌和耳炎苏黎士菌区分开来(两者 API Coryne 的数字代码相同)。MALDI-TOF MS 和 16S rRNA 基因测序可以正确鉴定该菌,已有报道非发酵棒杆菌非发酵亚种通常对 β-内酰胺类抗菌药物敏感,但对多种抗生素种类耐药[40,122]。根据 WGS 结果,标准菌株基因组大小为 2.3 Mb,G+C 含量 64.8%[123]。

(3)非发酵棒杆菌嗜脂亚种(*C. afermentans* subsp. *lipophilum*):非发酵棒杆菌嗜脂亚种[121]主要分离自血培养和表皮伤口。培养 24 h 后菌落呈凸面、光滑、直径<0.5 mm 的典型亲脂性棒杆菌。非发酵棒杆菌嗜脂亚种具有氧代谢,且不发酵糖类产酸。该种是唯一表现出 CAMP 反应阳性的非发酵的亲脂性棒杆菌。API Coryne 数据库中不包含非发酵棒杆菌嗜脂亚种。该种的数字代码是 2100004,所以通过这种方法,并不能更好地区分非发酵棒杆菌嗜脂亚种、耳棒杆菌或耳炎苏黎世菌。利用 MALDI-TOF MS 系统鉴定该亚种的相关信息缺乏。抗菌药物敏感试验也无法区分亚种,不过在一个病例报告中显示,从患者分离出的这个亚种仅对克林霉素和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑耐药[124]。

(4)无枝菌酸棒杆菌:无枝菌酸棒杆菌是人类皮肤微生物,但从健康人群的咽拭子中无法分离到[120]。无枝菌酸棒杆菌是人类临床材料中最常遇到的棒杆菌种,多分离自血培养、伤口、尿、假肢和其他部位[2]。培养 24 h 后菌落呈典型的干燥蜡状,边缘不规则,灰白色,直径 1~2 mm(图 29-4a)。无枝菌酸棒杆菌实际上可产生发酵代谢,且生化反应有显著的可变性。过去常常误鉴定为与其生化反应类似的干燥棒杆菌、纹带棒杆菌或极小棒杆菌[125-126],这些种可以通过以下反应加以区分:无枝菌酸棒杆菌和极小棒杆菌不在 20℃生长但干燥棒杆菌和纹带棒杆菌可以;另外,干燥棒杆菌不在 42℃发酵葡萄糖,而其他 3 种可以;且极小棒杆菌和纹带棒杆菌可以从甲酸盐产碱但无枝菌酸棒杆菌和干燥棒杆菌不可以[126]。API Coryne 系统可以正确地识别该种,但在任何情况下都必须进行更多的鉴定反应以确认是否存在无枝菌酸棒杆菌。MALDI-TOF MS 系统一般可以正确鉴定该种[106-107,111],或者将其报告为与干燥棒杆菌密切相关[1]。无枝菌酸棒杆菌通常为多重耐药菌[40,122]。根据 WGS 结果,一株分离自健康女性阴道的无枝菌酸棒杆菌基因组大小为 2.59 Mb,G+C 含量为 58.7%(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2023? genome_assembly_id=304500)。

(5)阑尾炎棒杆菌(*C. appendicis*):文献描述的阑尾炎棒杆菌最初分离自 1 例阑尾炎伴脓肿形成的患者[127]。该亲脂性种包含大量 TBSA(占全部 CFA 的 50%以上),这在其他任何棒杆菌种都不曾见过。其通过碱性磷酸酶反应阳性而硝酸盐还原反应和蔗糖发酵反应阴性以区分 CDC 棒杆菌群 F-1 细菌。该独特菌株除对红霉素和克林霉素具有耐药性外,对其他抗菌药物敏感。根据 WGS 结果,菌株阑尾炎棒杆菌 DSM 44531^{T} 的基因组大小为 2.25 Mb,G+C 含量为 64.3%

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/? term=appendicis)。

(6)畏水棒杆菌(*C. aquatimens*):亲脂性菌种畏水棒杆菌分离自1例菌血症患者的血培养。与其发育分型最相近的是图斯卡尼亚棒杆菌(*C. tuscaniense*),而表型上其类似银堡棒杆菌(*C. argentoratense*),而因α-糜蛋白酶和半胱氨酸芳胺酶试验阴性从而区分开来。API Coryne系统对畏水棒杆菌提供的数字代码是2100104,产黏液棒杆菌(*C. mucifaciens*)和银堡棒杆菌也可能是这个代码。不过畏水棒杆菌的亲脂性菌落及蔗糖发酵反应阴性可与这些菌轻易地区分开来;目前还没有与这个菌相关的MALDI-TOF MS系统鉴定数据报告出来。这个菌对大多数抗生素都敏感[128]。

(7)银堡棒杆菌(*C. argentoratense*):Fernandez-Natal等论述中提到,银堡棒杆菌[129]可以从人体咽喉、血培养、下呼吸道和耳道样本中分离获得[130]。菌落形态呈奶白色,不溶血,轻微粗糙,且培养48 h后直径为2 mm。银色棒杆菌在表型上和核糖阴性的科伊尔棒杆菌(*C. coyleae*)非常相似;具有表达α-糜蛋白酶活性的能力。API Coryne代码包括2100104(24 h)和2100304(48 h)。MALDI-TOF MS方法可以有效地鉴定银色棒杆菌菌株[130]。菌株为多重耐药菌[40,130]。WGS结果表明菌株全基因组大小为2.0 Mb,G+C含量58.9%[130]。

(8)非典型棒杆菌(*C. atypicum*):罕见性非典型棒杆菌可能是唯一医学相关吡嗪酰胺酶阴性而具有β-葡糖醛酸酶活性的棒杆菌。同上所述,该菌检测不到棒杆菌酸[15],但是WGS检测出了合成分枝菌酸的基因;该菌基因组大小为2.3 Mb,G+C含量为65.5%。

(9)金色黏液棒杆菌(*C. aurimucosum*):最初对金色黏液棒杆菌的描述是在5%SBA平板上呈微黄色黏滑的单菌落,但在不含血的胰蛋白酶大豆琼脂上呈无色黏滑的菌落[131]。实际上一些原属于CDC棒杆菌4组的细菌[与产棕黑色色素的黑色棒杆菌(*C. nigricans*)型一致]应被归为金色黏液棒杆菌[132],因此,金色黏液棒杆菌菌株能产灰黑色色素,这在任何其他棒杆菌都不曾有,且这些细菌是从女性泌尿生殖道分离得到(图29-4g)。这种色素的合成与质粒pET44827上的基因有关,认为是阴道过氧化氢浓度过高的环境所导致[118]。龋齿罗氏菌的部分菌株也可以产炭黑色色素[132](图29-4h);这些菌株由于硝酸还原酶一直阳性,部分触酶反应阴性,利用MALDI-TOF MS系统[106,111]及16S rRNA基因测序可以和金色黏液棒杆菌菌株区分开来。产色素金色黏液棒杆菌的API Coryne代码包括0000125、2000125和2100327。从系统发育上来说,金色黏液棒杆菌的16S rRNA基因测序结果与独特棒杆菌和极小棒杆菌密切相关(一致性>98.8%),但是其可以通过部分*rpoB*基因序列分析而区别开。金色黏液棒杆菌菌株被报道分离自无菌体液、假体关节感染[133]和尿路感染(UTIs)[1],为多重耐药菌[40,122]。金色黏液棒杆菌菌株(原命名为黑色棒杆菌CN-1^{T})的WGS基因组大小为2.81 Mb,G+C含量为60.5%[118]。

(10)耳棒杆菌:耳棒杆菌[134]几乎只分离自耳部。菌落呈干燥、轻度黏着但不穿透琼脂,随着培养时间增加菌落呈淡黄色,培养48 h后菌落直径为1~2 mm。耳棒杆菌不产酸。所有耳棒杆菌的CAMP试验强阳性。该菌API Coryne系统的数字代码是2100004,与其他几种代谢不活跃的棒杆菌和耳炎苏黎世菌相同。值得注意的是,耳棒杆菌对β-内酰胺类抗生素的MIC值有所增高,其中3株参考菌株对红霉素和克林霉素具有耐药性[40]。

(11)犬耳棒杆菌(*C. auriscanis*):犬耳棒杆菌过去只在犬的口腔中发现过,在被犬咬伤后引起了人类的伤口感染[1,13]。该菌的API Coryne代码是4100104(低信度下鉴定结果为牛棒杆菌)且通过16S rRNA基因测序结果为犬耳棒杆菌;可口服土霉素以及清创术治疗感染。该临床犬分离株的基因组为2.5 Mb,G+C含量为58.5%[135]。

(12)牛棒杆菌(*C. bovis*):亲脂性牛棒杆菌通常与牛的疾病有关,但在极少数情况下会引起人类感染。一株氧化酶阳性人血培养的牛棒杆菌菌株通过16S rRNA基因测序鉴定,其API Coryne的代码是0101104[136]。Sbaai等报道了一例败血症病例[137],表明该菌种可引起眼部感染[73]。一株牛棒杆菌的参比菌株WGS基因组大小为2.5 Mb,G+C含量为72.5%[138]。2株菌均对所有抗生素药物敏感[40]。

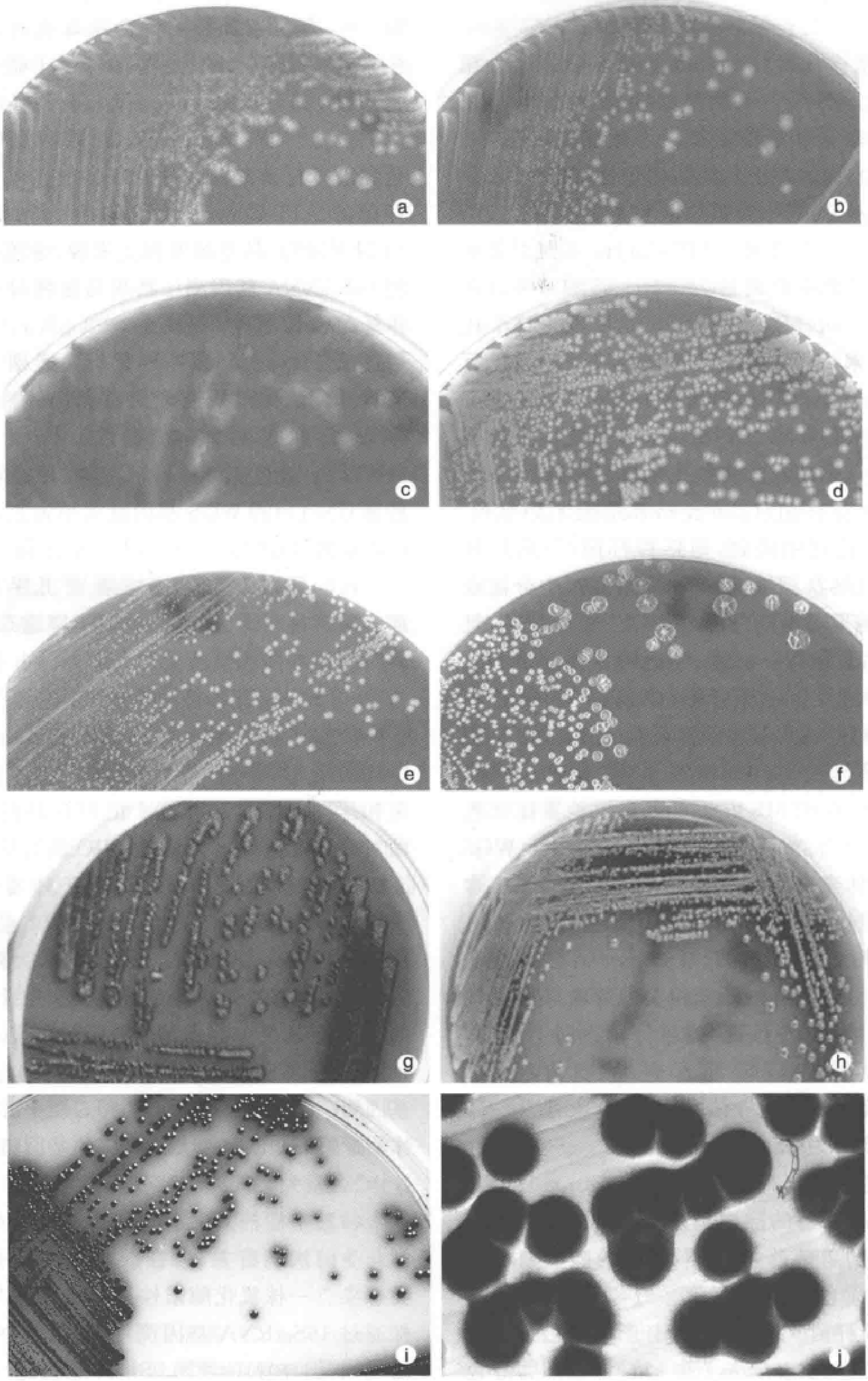


图 29-4 不同棒杆菌 SBA 上培养 48 h 后的菌落形态

注：a. 无枝菌酸棒杆菌 LCDC 91-0077；b. 白喉棒杆菌 ATCC 14779；c. 产黏液棒杆菌 LCDC 97-0202；d. 纹带棒杆菌 ATCC 6940^{T}；e. 人皮杆菌 ATCC 51325；f. 龋齿罗氏菌 LCDC 95-0154；g. 金色黏液棒杆菌 LCDC 91-0032(96 h 后)；h. 产黑色素龋齿罗氏菌 HC-NML 77-0298(96 h 后)；i. 培养于 Tinsdale 琼脂平板的肌无力型白喉棒杆菌(照片由洛杉矶 UCLA 医学院的 C. Hinnebusch 和 M. Cohen 提供) j. 底物中的厄氏菌，显示有假菌丝，见彩插

(13)犬棒杆菌(*C. canis*):非亲脂性的犬棒杆菌分离自犬咬伤后的伤口感染部位[139]。犬棒杆菌有特殊的显微镜下特征:其呈丝状杆菌(长>15 μm),部分细胞甚至有分枝。犬棒杆菌是七叶苷水解酶(esculinase)和 α-葡糖苷酶阳性,且是唯一表达胰蛋白酶活性的棒杆菌。

(14)混淆棒杆菌(*C. confusum*):混淆棒杆菌分离自患者足部感染、血培养[140]和乳腺脓肿[136]。菌落呈白色,透亮,凸起,黏滑状,且培养 48 h 后直径达 1.5 mm。葡萄糖产酸反应较弱,48~72 h 后在 API Coryne 或 API 50CH gallery 中可见。培养 48 h 后,API Coryne 系统对该种提供数字代码 3100304;乳腺脓肿分离的菌株的代码则是 3100104。有趣的是,分离自乳腺脓肿的菌株 CAMP 也是阳性,使得其和科伊尔棒杆菌(*C. coyleae*)更难以区分[136]。如果判定葡萄糖发酵试验阴性,则混淆棒杆菌菌株则可能误鉴定为丙酸棒杆菌(*C. propinquum*)。要准确鉴定应包括分子鉴定方法,一些文献中描述了采用 MALDI-TOF MS 方法鉴定混淆棒杆菌。

(15)科伊尔棒杆菌(*C. coyleae*):科伊尔棒杆菌[141]主要分离自血培养和其他正常无菌体液培养,但其也可以分离自各种其他无菌体液、脓肿和泌尿生殖道标本[1,136,142]。菌落呈白色微透亮,边缘完整状,且培养 24 h 后直径约为 1 mm。菌落都是奶油状或黏滑状。缓慢发酵葡萄糖产酸且 CAMP 反应强阳性是最重要的表型特征。科伊尔棒杆菌胱氨酸芳胺酶阳性,这在许多其他棒杆菌都未观察到。已有发现多种 API Coryne 数字代码,尤其是 2100304 和 6100304,因此结合这 2 种数字代码,以及 CAMP 反应强阳性特征,可认定为科伊尔棒杆菌。MALDI-TOF MS 可以正确鉴定该菌种[109,111,143]。菌株通常为多重耐药菌,对大环内酯类和林可霉素类抗生素耐药[40,122]。

(16)棒杆菌 CDC F-1 群:亲脂性 CDC 组 F-1 细菌最早是在 1981 年描述[102],这个名字一直沿用至今。通过 16S rRNA 基因测序和化学特征鉴定,CDC 组 F-1 细菌的特征与棒杆菌属的是一致的[2]。对 4 株 16S rRNA 基因序列非常接近(相似性>98.8%)的 CDC 组 F-1 细菌进行 WGS 全基因组测序分析,基因组大小为 2.30~2.44 Mb,G+C 含量为 60.4%~60.7%,它们代表了 3 个独立的分类群,不过通过表型鉴定却无法很好地区分开来。CDC 组 F-1 细菌可为多重耐药菌,对红霉素、克林霉素和少数几种抗生素耐药[40]。

(17)白喉棒杆菌:白喉棒杆菌通常分为 4 个生物型:重型、轻型、贝尔凡蒂型和中间型;"生物型"和"生物变种"2 个词经常互换着说,所以本章节中采用"生物型"这个描述。最初,这些生物分型是由菌落形态和生化反应的差异所定义的。然而,只有中间型白喉棒杆菌可以通过菌落形态(小,灰色或半透明亲脂性菌落)鉴定,但在生化反应方面却和轻型白喉棒杆菌相近(API Coryne 系统糖原反应阴性),尽管有些菌株在试管底物中糖原试验阳性(Bernard,未发表数据)。其他白喉棒杆菌产生较大(培养 24 h 后直径达 2 mm)的白色或不透明菌落(图 29-4b),这无法使彼此区分开。亲脂性白喉棒杆菌中间型在临床感染中很少出现。白喉棒杆菌的不同生物型同样也无法在 WGS 水平研究区分开来[145]。利用多位点序列分型(MLST)方法分析表明,白喉棒杆菌贝尔凡蒂型与其他生物型相比具有更独立的一个进化分支[146]。

对白喉棒杆菌、假结核棒杆菌和溃疡棒杆菌的假设鉴定,可以通过检测可疑革兰阳性杆菌是否存在胱氨酸酶(通过添加有亚碲酸盐的选择性培养基,如新鲜制备的 Tinsdale 基质或鉴定板,可以观察到黑色菌落周围产生黑色晕圈(图 29-4i)。而该属的其他菌在此选择培养基中的菌落形态则较小,黑色菌落但不产黑色晕圈。这些形态结果,加上白喉棒杆菌不产吡嗪酰胺酶(如 API Coryne 系统阴性反应结果)可以鉴定产白喉毒素的白喉杆菌。值得注意的是,有些白喉棒杆菌在添加了一定浓度的亚碲酸盐选择培养基中可能无法良好生长[147]。如上文所述,传统的生化反应、API Coryne 系统、MALDI-TOF MS 和分子方法可以准确鉴定白喉棒杆菌。一般情况下,白喉棒杆菌是不发酵蔗糖的,但在巴西,已有报道分解蔗糖的菌株,但是根据 *rpoB* 基因测序分析,这些菌株与更典型的蔗糖阴性表型菌株一致[148]。

白喉毒素试验:白喉毒素体内毒性和体外细胞毒性试验方法在一些地方仍然在做[98],不过这里主要讨论国际上各个白喉研究中心最常用的方法,即核酸扩增试验(NAAT)和 Elek 试验。Elek 免疫沉淀试验包括将一个含白喉抗毒素(10 U/纸

片)的纸片放置在接种有对照和试验菌株的 Elek 平板上;当抗毒素通过琼脂扩散时,它仅与产生白喉毒素的菌株形成一条沉淀线,如图 29-3b[149]所示。

在具有检测白喉毒素并解释检测结果的能力的实验室中,采用改良的 Elek 方法[149],检测白喉毒素时推荐至少挑取白喉棒杆菌和相关菌种多个菌落。近年来,抗毒素的生产和国际库存已经停止或大大减少,这是涉及相关试验的实验室所关注的问题[150]。基于 NAAT 检测白喉毒素基因(*tox*)的方法自 20 世纪 90 年代开始就已经使用[151]。实时荧光法检测 *tox* 基因已得到广泛应用;针对溃疡棒杆菌以白喉棒杆菌 *tox* 基因为目的片段的引物修改后效果更好[92-93]。基于 NAAT 的白喉棒杆菌和溃疡棒杆菌检测已在 Lightcycler(Roche)和 ABI(Thermo Scientific)平台[152]上得到开发,Berger 等已在文献中描述了方法[98]。英国公共卫生部用 *rpoB* 和 *tox* 靶基因实时荧光 PCR 法检测白喉棒杆菌和溃疡棒杆菌/假结核棒杆菌的可疑菌株[96]。Mancini 等描述了一个类似的方法[95]。要注意的是,NAAT 法检测样本中的毒力基因不能把其自动归为某一个种,因为白喉棒杆菌、溃疡棒杆菌和假结核棒杆菌可能均含有携带白喉毒力基因的噬菌体。

所谓的不产毒素但携带 *tox* 基因的菌株,即 NAAT 阳性但 Elek 试验阴性的菌株,已经在多个国家被发表描述[81,98,153]。大多数引起皮肤感染的是非产毒的白喉棒杆菌,如 PCR 检测不到白喉毒素基因,也可造成严重的疾病,如皮肤病,心内膜炎的爆发,或无家可归者、酗酒者和静脉注射吸毒者的偶见死亡病例[84]。非产毒白喉棒杆菌在英国流行,已经表明白喉毒素阻遏(*dtxR*)基因是功能性的,所以如果这些菌株被噬菌体溶原化,其可以成为储存白喉棒杆菌毒性的容器。英国公共卫生指南指出,不产毒素、携带 *tox* 基因的菌株没有发现会导致呼吸白喉,因此,患者无须接受抗毒素治疗,除非他们表现出全身性疾病的迹象。但是,由于它们具有更高的(尽管无法量化)产毒素的风险,因此建议以与完全产毒素(即 Elek 阳性,表达毒素的)菌株相同的方式使用抗生素杀死,患者及无症状携带者均是如此,且感染者的密切接触者也建议进行接触追踪[89]。

抗生素治疗用以杀死白喉棒杆菌并防止其扩散,但抗生素不能代替抗毒素的预防作用,供选择的抗生素是青霉素或者大环内酯类。少数白喉棒杆菌对红霉素或利福平耐药已有报道,而多重耐药也有报道,但极为罕见[154-157]。最新的一项对 195 株白喉棒杆菌的研究中,近 17%的菌株对红霉素不敏感,并且相当数量的白喉棒杆菌对一种或多种头孢菌素及其他药物的 MIC 范围处于中等或耐药类别。CLSI 指南 M45-3 中青霉素折点的改变会使大部分白喉棒杆菌置于中等(不敏感)类别[40]。白喉棒杆菌的很多菌株都已进行了 WGS 全基因组测序分析,在 NCBI 中上传的 16 个全基因组数据中,基因组大小范围在 2.40~2.53 Mb,G+C 含量为 53.4%~53.7%。

(18)坚硬棒杆菌(*C. durum*):坚硬棒杆菌最初认为只能从呼吸道样本中分离[158],目前发现,典型的分离株也可从牙龈间、血、脓肿中分离出来[159]。坚硬棒杆菌是从健康人群咽拭子分离的最常见的棒状菌属[66],但却从未在健康成人鼻咽样本中发现过[120]。因此,它的致病机制还不清楚。坚硬棒杆菌是特殊的不具亲脂性的微生物,需氧培养后 72 h 后,菌落直径为 0.5~1.0 mm。有关这种菌的最初描述为米黄色,有着波状边缘的粗糙型菌落,在有氧环境下与琼脂平板黏附较紧[158]。然而,后来这种菌被描述为光滑,而且不一定黏附在琼脂上[159]。对需氧培养物进行革兰染色,可观察到长条棒状体,偶尔呈现凸起,但真正的坚硬棒杆菌分离株没有像马氏棒杆菌那样的鞭子柄。当细胞在含有 10% CO_2 的环境中生长中,坚硬棒杆菌未呈现长条状,长条的形状也未在在其他棒杆菌种(除犬棒杆菌)有发现[158]。大多数的犬棒杆菌(并非所有)发酵甘露醇,这也是棒杆菌中不常见的特点之一[159]。口腔中的坚硬棒杆菌株可在一种选择性培养平板中获得生长[160]。

(19)斐氏棒杆菌(*C. falsenii*):斐氏棒杆菌是一种罕见的人类病原菌,主要分离自无菌体液(脑脊液和血液)[161-162]。培养 24 h 后菌落白色透亮,光滑有完整边缘,直径 1~2 mm。72 h 后,大多数的菌株会呈黄色,并且随着时间颜色会加深。该菌最典型的生物化学特征是缓慢发酵葡萄糖产生酸性产物。微弱的吡嗪酰胺酶反应,而且只在 Christensen 尿素肉汤培养基或 API Coryne 系统过夜培养后呈现微弱的脲酶活性。其在 API 鉴定

系统中的编码是 2101104 和 2101304[136,161]。该菌与野生和家养鸟类有关，作为携带者，一篇关于斐氏棒杆菌生活环境和 WGS 研究结果的小综述表明，其基因组大小为 2.67 Mb，G+C 含量为 63.1%[163]。该菌对头孢菌素或甲氧苄啶-磺胺甲噁唑[40,162]有耐药性。

(20)弗赖堡棒杆菌(*C. freiburgense*)：非亲脂性菌弗赖堡棒杆菌可能通过犬咬传染给人类[164]。生长 5 天的菌落呈现肉眼可见特殊的车轮形态，这在其他棒杆菌中见不到，但在龋齿罗氏菌可见到。菌落与血平板紧密黏附。其特殊的特点是缺少吡嗪酰胺酶活性，β-半乳糖苷酶阳性。

(21)弗雷尼棒杆菌(*C. freneyi*)：弗雷尼棒杆菌最早从皮肤中发现[165]，现在有证据表明弗雷尼棒杆菌也可从泌尿道分泌物、十二指肠活检标本和血液[166]及肉芽肿性乳腺炎中分离出来[167]。该菌进化史与干燥棒杆菌比较接近。典型的菌落皱缩，白色，干燥，粗糙，有不规则边缘；48 h 后直径为 0.5～1.0 mm。弗雷尼棒杆菌非亲脂性，基础生化特点与干燥棒杆菌和汉森棒杆菌相似。就目前研究所知，所有弗雷尼棒杆菌呈现 α-葡糖苷酶活性，这在棒杆菌中并不常见(很少的无枝菌酸棒杆菌和所有的干燥棒杆菌菌表达该酶)。该菌在 42℃时发酵葡萄糖，在 20℃生长，这两点可与干燥棒杆菌区别。这 2 种菌在 16S rRNA 基因序列上与汉森棒杆菌也十分相似(相似性约为 98.9%)，*rpoB* 基因序列可能有差异。弗雷尼棒杆菌为多重耐药菌[40]。WGS 基因组大小为 3.04 Mb，G+C 含量为 68.8%(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/16465)。

(22)解谷氨酸棒杆菌(*C. glucuronolyticum*)：解谷氨酸棒杆菌已从有症状的男性前列腺和泌尿生殖道中发现[1,74,168]，它也在患有不明原因发热的传染性前列腺炎患者身上发现[169]。有文献记载该菌可在女性和男性血培养[136]，以及 1 个男性肉芽肿性乳腺炎病例中分离得到[167]。培养 24 h 后菌落为黄白色，凸起，奶油状，直径为 1.0～1.5 mm。该菌以基础生化反应多变著名。这是唯一的医学相关的表达 β-葡糖醛酸酶的棒杆菌属。当其呈现脲酶时，该菌会在 Christensen 尿素肉汤中大量生长，在室温下培养 5 min 即呈阳性[168]。解谷氨酸棒杆菌也是为数不多的能水解七叶苷的棒杆菌，所有的解谷氨酸棒杆菌 CAMP 反应阳性(图 29-3a)。MALDI-TOF MS 系统对鉴定该菌种来说应该是一个非常有用的工具[109,111,143]。菌株为多重耐药菌[40,167]。基于 WGS，解谷氨酸棒杆菌标准菌株的基因组大小为 2.82 Mb，G+C 含量为 59.1 %(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2035? genome_assembly_id=314252)。

(23)汉森棒杆菌(*C. hansenii*)：汉森棒杆菌菌落黄色、干燥[107]。如上所述，其生化鉴定反应与弗雷尼棒杆菌和干燥棒杆菌类似。然而，汉森棒杆菌碱性磷酸酶和 α-葡糖苷酶阴性，这点可与上述两种菌区分。

(24)模仿棒杆菌(*C. imitans*)：模仿棒杆菌最初分离自疑似患有白喉儿童的鼻咽部标本，以及与该儿童密切接触的 3 个成人中[171]。这是第 1 例证据充分的除白喉棒杆菌外在非医院环境中人与人传播的棒杆菌。模仿棒杆菌的其他菌株都是从血培养和尿中分离得到[136]。菌落呈灰白色，边缘透亮，黏滑，直径 1～2 mm。该菌株在 Tinsdale 培养基中不产棕色环，但亚碲酸盐还原酶阳性。吡嗪酰胺酶活性较弱，由于蔗糖发酵试验，可导致最初误鉴定为非典型白喉棒杆菌。过去模仿棒杆菌可能被误鉴定为极小棒杆菌(*C. minutissimum*)，因为这 2 个类群的生化反应很相似。然而，模仿棒杆菌的 CAMP 反应阳性，这与极小棒杆菌结果相反。API Coryne 系统对模仿棒杆菌提供的数字代码是 1100325、2100324 和 3100325，表明 α-葡糖苷酶反应阴性，而白喉棒杆菌表达这种酶。使用 Elek 试验检测白喉毒素及 PCR 检测 *tox* 基因，模仿棒杆菌均为阴性[171]。一株从疑似患有白喉的婴儿中分离出的模仿棒杆菌完成了 WGS 全基因组测序，基因组大小为 2.56 Mb，G+C 含量为 64.3 %，并且含有与 MDR 相关的耐药基因[172]，尽管该菌株可能是全敏感的[40]。

(25)杰氏棒杆菌(*C. jeikeium*)：杰氏棒杆菌是一种临床标本中最常见的棒杆菌之一，与心内膜炎、败血症、假体、血培养、心脏瓣膜、骨髓、胆汁、伤口、泌尿道感染和其他感染有关[1,4]。该菌种一直以来被认为是正常皮肤微生物群的一部分[173]，但也在健康个体的鼻咽中有发现[120]，在院内感染中也有报道。杰氏棒杆菌菌落形态微小，

灰白色，边缘完整。杰氏棒杆菌是严格的需氧菌，可以氧化葡萄糖或麦芽糖产酸，而非分解果糖产酸(结核硬脂酸棒杆菌是由果糖产酸)。该菌种是生长较慢的亲脂性菌种，在体外生长或做生化反应试验时至少需要培养 48 h。要鉴定杰氏棒杆菌，通常用 API Coryne 系统，提供的代码包括 21000004、2100104 和 2100304，此外分子方法可以鉴定该菌种(Bernard，未发表的数据)。但是这些方法均无法提供最明确的鉴定，因为杰氏棒杆菌和其他生长缓慢的菌种(耳炎苏黎世菌、耳棒杆菌、银堡棒杆菌和结核硬脂酸棒杆菌)非常相似，因此还需要一些其他的鉴定手段。RapID CB Plus 系统能正确地识别杰氏棒杆菌。MALDI-TOF MS 系统往往也能鉴定该细菌到种的水平[109,111,143]，尽管之前有报道使用旧版本数据库产生了错误识别。杰氏棒杆菌通常为多药耐药[40,122,174]，对达托霉素的耐药虽然少见，但已有报道[175]。

杰氏棒杆菌的全基因测序已经测定，表明其亲脂性表型与缺乏脂肪酸合酶有关[117]。通过 16S rRNA 和 *rpoB* 基因测序鉴定为杰氏棒杆菌的分离株可通过 WGS 分为四种独特类型，这表明该分类群内存在异质性，只有在 WGS 水平才能进行区分。这些分离株的基因组大小范围为 2.25～2.51 Mb，G+C 含量为 61.3%～62.9%[174]。Riegel 等在 20 世纪 90 年代曾暗示过杰氏棒杆菌菌株之间存在异质性[176]。

(26)克氏棒杆菌(*C. kroppenstedtii*)：克氏棒杆菌较为少见，最初在肺病患者的痰中发现[177]，但后来多在一些育龄妇女的罕见炎症性疾病、肉芽肿性乳腺炎患者中分离获得[178-181]。在一项研究中，该菌种主要是从厌氧伤口样本中分离获得的[1]。菌落在 37℃条件下培养 24 h 后呈灰色半透明，稍干燥，直径小于 0.5 mm。克氏棒杆菌是亲脂性的，是少数具有七叶苷酶活性的棒杆菌。克氏棒杆菌的 API 代码包括 0101104、2040104 和 2040105[136]，这些代码在 APIWEB 工具中给出的却是牛棒杆菌、纹带棒杆菌/无枝菌酸棒杆菌、银堡棒杆菌或解谷氨酸棒杆菌结果，提示该菌种不包括在该数据库中。尽管克氏棒杆菌抗菌药物敏感数据很少，部分原因是由于该菌在推荐的 AST 培养基上生长不良，但已有敏感株和 MDR 分离株的报道[40,178]。WGS 基因组大小范围为 2.44～2.57 Mb，G＋C 含量为 56.8%～57.5%，不存在脂肪酸合酶基因，一株 MDR 分离株完成了耐药基因岛的检测[178]。

(27)库奇棒杆菌(*C. kutscheri*)：库奇棒杆菌是啮齿动物中的一种共栖微生物。据报道，它是婴儿在被老鼠咬伤后引起皮肤和软组织感染的原因之一[182]，但在其他方面极少引起感染。该病例中的患者菌株通过 API Coryne 系统(代码 7051325)和 BBL Crystal 革兰阳性系统(Becton Dickinson；代码 2760041527)得到了准确鉴定，标准菌株通过 16S rRNA 基因测序也得到了 100%的鉴定。WGS 结果表明，该菌基因组大小为 2.35 Mb，G＋C 含量在所有棒杆菌中是最低的，为 46.46%[183]。

(28)嗜脂黄色棒杆菌(*C. lipophiloflavum*)和嗜脂黄色样棒杆菌(*C. lipophiloflavum*-like)：嗜脂黄色棒杆菌最初在一例细菌性阴道病患者发现，分离得到了单一菌株[184]。这类菌株是亲脂性的，菌落微黄色，外表略干燥，在大多数糖底物上不发生反应，脲酶活性弱，仅与所有测试中的几种酶反应。API Coryne 系统提供的代码为 2101004(使用 APIWEB 会被错误识别为牛棒杆菌)，因此应使用分子方法来识别该菌种。标准菌株 G+C 含量为 65%，且对大多数药物敏感。通过 WGS，菌株 DSM 44291^{T} 基因组大小为 2.39 Mb，G+C 含量为 64.8%(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2075)。有证据表明，一株或更多的与嗜脂黄色棒杆菌接近的新菌种已经获得检测。一些从血培养中获得的分离株，与嗜脂黄色棒杆菌标准菌株 16S rRNA 基因序列相似性＜98.3%，它们彼此之间的相似性＞99.9%～100%(GenBank 登录号 FJ269041、GQ869560、GU304647、GU30464 和 GU304651，来自德国和加拿大)。其中，加拿大分离株为黄色，与糖的反应性较差，不具有亲脂性，且尿素和 CAMP 反应呈阳性(Bernard，未发表)。

(29)劳氏棒杆菌(*C. lowii*)：在本手册第 11 版中，劳氏棒杆菌菌株是在“乳腺炎棒杆菌样细菌”组被描述的，最早是从日本患者的眼部感染中发现的。菌株亲脂性，产脲酶，缓慢利用各种糖和底物。生成的 API Coryne 代码为 0101205 或 01010305，会被 APIWEB 错误鉴定为麦氏棒杆菌。可通过 Bruker MALDI-TOF MS 系统鉴定该菌株。菌株通常对大多数抗菌药物敏感。这些菌

株的WGS基因组大小为2.36 Mb,G+C含量为62.8%;检测到了合成细胞壁霉菌酸酯的基因,但未检测到脂肪酸合成的基因,这证实了通过表型方法观察到的亲脂性特征[12]。

(30)麦氏棒杆菌(*C. macginleyi*):麦氏棒杆菌绝大部分分离自眼部标本[1,69,185-186],但作为一种条件病原菌,在呼吸机相关性肺炎、手术部位感染、败血症、心内膜炎、人工装置或心脏瓣膜感染、菌血症及其他来源中也有被发现[4,187-188]。麦氏棒杆菌菌落是典型的亲脂性棒杆菌,不表达吡嗪酰胺酶活性,与大多数其他棒杆菌不同,大部分麦氏棒杆菌菌株发酵甘露醇。API Coryne系统能够正确识别麦氏棒杆菌,MALDI-TOF MS系统也能正确鉴定该菌[109]。该种菌株对广谱抗菌药物敏感[40],但已有报道它对高水平氟喹诺酮类药物耐药[186]。

(31)马赛棒杆菌(*C. massiliense*):马赛棒杆菌从关节液中分离到。在任何碳水化合物试验中它均不产酸,这可与其他棒杆菌区分,因此分子方法是最好的鉴定方法。菌株对所有抗菌剂敏感[189]。

(32)马氏棒杆菌(*C. matruchotii*):马氏棒杆菌被认为是口腔内的固有细菌,特别是在牙结石和牙斑块沉积中,所以它已被口腔微生物学家进行广泛研究[159]。但同时它是一种非常罕见的人类病原体。菌落呈扁平、丝状或蜘蛛状,但菌落形态可变。马氏棒杆菌在革兰染色状态下可显示不寻常的外观,称之为鞭柄(即丝状菌的丝状体尾部与单个短杆菌相邻,创造了鞭的错觉)(图29-1f)。即使是已被保存多年的菌株,对其进行染色依然存在这种微观形态。从全球培养收集的马氏棒杆菌菌株存在异质性,其中一些菌株会被误认为坚硬棒杆菌菌株。马氏棒杆菌菌株不分解半乳糖,而坚硬棒杆菌呈阳性。API Coryne系统数据库不包含马氏棒杆菌,其API数字代码包括7000325、7010325和7050325。菌株对常用的药物均敏感[40]。菌株ATCC 14266^{T}的WGS全基因组大小为2.96 Mb,G+C含量为57.1%(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/2018)。

(33)马氏棒杆菌样菌株(*C. matruchotii*-like)(表29-2中未列):这个分类代表菌株只有1株:ATCC 43833。它被当作马氏棒杆菌保存在标准菌株目录中,但点杂交和16S rRNA基因测序数据(Genbank登录号AF260434)证明它是一个单独的种。菌落直径0.1 mm,灰白色,光滑,非黏性。生化反应类似于极小棒杆菌,除了ATCC 43833菌株在API Coryne系统中显示了七叶苷活性,该菌株API Coryne编码为2140325[159]。

(34)极小棒杆菌(*C. minutissimum*):极小棒杆菌是人体皮肤微生物的一部分,高度怀疑该菌与红癣相关。当用分子方法而不是生化方法鉴定后,金色黏液棒杆菌和氧化微杆菌从这种病变中被发现时,这种相关性就成了问题[190]。利用现代鉴定方法,极小棒杆菌是一种非常罕见的条件致病菌。菌落培养24 h后呈白色或浅灰色,有光泽,湿润,凹凸有致,圆形,有完整的边缘,直径为1~1.5 mm。大多数菌落滑腻,但有些也具有黏性。微小棒杆菌菌株能不同程度地发酵代谢蔗糖并产酸。少数微小棒杆菌菌株也能分解甘露醇产酸。从系统发育型上分析,通过16S rRNA基因测序结果显示微小棒杆菌与独特棒杆菌和金色黏液棒杆菌密切相关(>98.8%同源性),但通过部分*rpoB*基因序列分析很容易相互区分。通过16S rRNA和*rpoB*基因序列分析很难将微小棒杆菌与金色黏液棒杆菌完全区分,MALDI-TOF MS的结果也反映分辨率低于预期[107]。菌株NBRC 15361^{T}的WGS基因组大小为2.66 Mb,G+C含量为60.0%(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/14879?genome_assembly_id=264368)。

(35)产黏棒杆菌(*C. mucifaciens*):产黏棒杆菌主要分离自血培养和其他无菌体液样本[191],但它也可分离自脓肿、软组织、透析液[136]、空洞性肺炎[192]及耳鼻咽部[193]。菌落形态独特,呈现略明显的黄色且十分黏稠(图29-4c)。黏液棒杆菌是目前已知唯一呈现出这种有黏液菌落的棒杆菌,这一特性让细菌学家想起了马红球菌(*Rhodococcus equi*)菌落。胞外物质(可能是多糖)引起细胞菌丝间连接,已经被证实是黏液状菌落的超微结构。菌落培养24 h后大小为1.0~1.5 mm,并有完整边缘。延长培养96 h后,菌落黏液减少。产黏棒杆菌进行有氧代谢。它通常分解葡萄糖产酸,但也可由蔗糖产酸。产黏棒杆菌的API Coryne数字代码为2000004、2000104、2000105、2100104、2100105、6000004、6100104和6100105,

这表明通过该方法观察葡萄糖氧化可能过慢。β-内酰胺类和氨基糖苷类抗生素对产黏棒杆菌有很好的抑制活性。

(36)眼棒杆菌(*C. oculi*)：眼棒杆菌(*C. oculi*)在日本和欧洲患者的眼部感染中被发现，在本手册的第11版中，该菌是在乳腺炎棒杆菌样细菌组描述。菌株具有亲脂性，产脲酶，并缓慢利用各种糖和底物。API Coryne 数字代码为0101304、01010305、0101324 和 0101325。可使 Bruker MALDI-TOF MS 系统鉴定该菌株。菌株对所有抗菌药物敏感。通过 WGS 测定，这些菌株的基因组大小为 2.42 Mb，G+C 含量为 64.8%，检测到细胞壁霉菌酸酯合成的基因，但未检测到脂肪酸合酶的基因，这证实了表型上观察到的亲脂性[12]。

(37)皮尔巴拉棒杆菌(*C. pilbarense*)：皮尔巴拉棒杆菌是从患有痛风的男性患者的脚踝分离得到的。从生化反应上，它可以通过硝酸盐反应阴性与纹带棒杆菌和模仿棒杆菌区分开，通过不发酵麦芽糖与极小棒杆菌区分。从系统发育型上看，它和快速解脲棒杆菌(一个亲脂性菌种)、科伊尔棒杆菌、非发酵棒杆菌及产黏棒杆菌最接近(98.7%～99.0%的同源性)，但通过 *rpoB* 基因测序可与这些菌种鉴别开[194]。标准菌株对大多数抗菌药物敏感，但对红霉素、克林霉素和某些头孢菌素具有抗性[40]。

(38)丙酸棒杆菌(*C. propinquum*)：在系统发育型上，丙酸棒杆菌与假白喉棒杆菌[120]最接近，具有相同的分离部位(即健康成人鼻咽)。该菌种还与肺炎[195]、心内膜炎[196]和角膜炎[72]有关。该菌落发白，边缘略干涩，培养 24 h 后菌落直径为 1～2 mm。它能够降解硝酸盐和水解酪氨酸，且历史上描述其无法水解尿素，假白喉棒杆菌硝酸盐还原和尿素水解均为阳性。然而，最近的研究表明，某些丙酸棒杆菌能够产生脲酶，因此在生化特征上很难区别这两个菌[112]。它们的 16S rRNA 基因序列同源性>99%，或许可以通过 *rpoB* 序列分析进行区分，MALDI-TOF MS 系统也很难正确区分这两个菌[112]。API Coryne 系统和 RapID CB Plus 系统可以正确识别不水解尿素的丙酸棒杆菌菌株。丙酸棒杆菌菌株对红霉素和克林霉素具有耐药性，并且少数菌株对其他抗菌药物也具有耐药性[40]。

(39)假白喉棒杆菌(*C. pseudodiphtheriticum*)：假白喉棒杆菌是口咽部微生物的一部分[120]。如 Van Roeden 等所述[197]，该菌株被证实能在不同的患者中引起肺炎，包括在囊性纤维化患者中暴发[198]。由该菌引起的其他感染包括尿路感染、伤口、心内膜炎和皮肤溃疡[199]。假白喉棒杆菌菌落发白，整个边缘干燥，培养 48 h 后直径为 1～2 mm。这类非发酵菌能降解硝酸和水解尿素，但其任何碳水化合物试验均不产酸。假白喉棒杆菌菌株对β-内酰胺类抗菌药物敏感，但有报道其对大环内酯类和林可酰胺类耐药[40]。经 WGS 测序分析，菌株 DSM 44287^T 的基因组大小为 2.26 Mb，G+C 含量为 55.3%(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_JIAH00000000.1)。MALDI-TOF MS 系统可能难以区分该菌种和丙酸棒杆菌[112]。

(40)假结核棒杆菌(*C. pseudotuberculosis*)：在系统发育型上，假结核棒杆菌 16S rRNA 基因序列最接近溃疡棒杆菌(同源性>99%)及白喉棒杆菌(同源性约 97.1%)，这些菌种类似，可能含有白喉毒素基因且表达白喉毒素。要准确地区分它们可通过 *rpoB* 测序分析[115]，MALDI-TOF MS 系统也可区分它们[105]。培养 24 h 后，菌落呈淡黄白色，不透明，凸起，直径约为 1 mm。和溃疡棒杆菌相同，假结核棒杆菌脲酶和 CAMP 抑制试验阳性。假结核棒杆菌在硝酸盐还原和蔗糖发酵反应上均存在可变性。API Coryne 系统和 RapID CB Plus 能正确识别这个菌种，但鉴定应通过分子方法加以证实。该菌种通常与干酪性淋巴结炎(主要在绵羊和山羊)及马、牛和其他动物的感染有关；人类疾病通常与职业性处理或从受感染动物中摄取肉类有关[101]。分离自人类病例的假结核棒杆菌应进行疑似白喉的检查，包括检测菌株是否产白喉毒素和对感染者密切接触者的调查，在这过程中可能涉及与兽医部门的合作。具体操作流程如图 29-2 所示。1 例患有坏死性淋巴结炎的 12 岁女孩分离出的假结核棒杆菌通过 WGS 全基因组测序进行了毒力因子的分析[200]，并在获得后提供了动物菌株与人类分离株之间的联系[201]。人类分离株的药敏试验数据与动物来源的数据相比少很多，但据报道其对大多数抗菌药物敏感[201]。

(41)产丙酮酸棒杆菌(*C. pyruviciproducens*)：产丙酮酸棒杆菌最早分离自腹股沟脓

肿[202]。后来从尿道拭子、脓肿、尿、骨活检标本、关节滑液，及加拿大和瑞士的血培养物中分离获得大量该菌，从而进一步完善了该菌的生化及其他特征[203]。菌株可能对β-内酰胺类、氟喹诺酮类、大环内酯类、林可酰胺类、四环素类和叶酸途径抑制剂耐药[203]。

(42)多耐棒杆菌(*C. resistens*)：多耐棒杆菌具有亲脂性，菌落呈灰白色，光滑、有光泽。吡嗪酰胺酶反应阴性，该特点能区分与其表型相似的杰氏棒杆菌和结核硬脂酸棒杆菌[204]。此外，多耐棒杆菌在厌氧条件下生长缓慢，而杰氏棒杆菌则不同。文献报道的多耐棒杆菌菌株对青霉素、头孢菌素类、氨基糖苷类、克林霉素和环丙沙星耐药，但对万古霉素、利奈唑胺和达托霉素敏感[40,204]。通过WGS发现菌株基因组大小为2.6 Mb，G+C含量为57.1%，确认了亲脂性是因为缺乏脂肪酸合酶基因，并发现了质粒携带耐药基因及其他假定的毒力因子[205]。

(43)里格尔棒杆菌(*C. riegelii*)：里格尔棒杆菌最初从女性尿路感染[206]中分离得到，但也可从血培养中获得，包括脐带血[136]及尿脓毒症老年人的尿[207]。培养48 h后可见菌落呈白色，凸起，有光泽，直径可达1.5 mm。菌落或黏稠，或呈奶油状。里格尔棒杆菌接种于Christensen尿素肉汤后，室温培养5 min即表现出很强的脲酶活性。里格尔棒杆菌的特性是能缓慢发酵麦芽糖而不发酵葡萄糖。其他棒杆菌属细菌没有表现出该特征。里格尔棒杆菌的API Coryne系统代码包括0101224、2001224和2101224，MALDI-TOF MS系统可以鉴定该菌[106,111]。一株尿中分离的里格尔棒杆菌WGS显示基因组大小为2.56 Mb，G+C含量为60.5%[208]。

(44)模仿棒杆菌(*C. simulans*)：模仿棒杆菌最初报道的3株菌株是来自皮肤相关的标本(足脓肿、淋巴结活检标本和疖)[209]，还分离自血培养、胆汁[136]和人工关节感染[133]。模仿棒杆菌菌落呈灰白色，有光泽，奶油状，直径1～2 mm，菌落形态和极小棒杆菌、独特棒杆菌、纹带棒杆菌非常相似，其亲缘关系相近。模仿棒杆菌是至今棒杆菌属中唯一能同时还原硝酸盐和亚硝酸盐的。API Coryne系统代码包含0100305、2100105、2100301、2100305和3000125(包括因为亚硝酸盐强还原反应导致的硝酸盐还原反应假阴性)。已发现部分菌株对红霉素、克林霉素、四环素和环丙沙星具有耐药性[40]。

(45)独特棒杆菌(*C. singulare*)：独特棒杆菌菌落和极小棒杆菌、纹带棒杆菌菌落一样呈圆形，边缘微凸，奶油状[210]。关键生化反应和极小棒杆菌一样，除了其具有脲酶活性。API Coryne系统代码是6101125，表明具有吡咯烷酮芳胺酶活性。从系统发育型上说，通过16S rRNA基因测序发现该菌种与金色黏液棒杆菌和极小棒杆菌密切相关(>98.8%的同源性)，但通过部分*rpoB*基因序列分析极易进行区分。

(46)痰棒杆菌(*C. sputi*)：痰棒杆菌最初是从肺炎患者的痰中分离出来的。它是唯一表达α-葡糖苷酶活性，亲脂性和产脲酶的棒杆菌[212]。

(47)固态棒杆菌(*C. stationis*)和产氨棒杆菌(*C. ammoniagenes*)：固态棒杆菌，原名固态短杆菌(*Brevibacterium stationis*)，2010年被重新分到棒杆菌属[213]。固态短杆菌ATCC 14403^{T}最初是从海水中获得，但随后的研究发现2株成人的血培养分离株，加上从婴儿粪便中分离的"产氨棒杆菌"ATCC 6872，形成了一个固态棒杆菌的单独分类组。无论是使用Simmon柠檬酸还是在API 20E条中的高浓度柠檬酸，固态棒杆菌和产氨棒杆菌严格地说都表现出碱化柠檬酸的能力，而棒杆菌属其他成员没有相关特点。固态棒杆菌菌落24 h生长良好，非亲脂性，呈黄色或淡黄色，发酵葡萄糖、果糖、核糖、甘露糖。所有固态棒杆菌菌株柠檬酸盐碱化阳性，产脲酶，还原硝酸盐。API Coryne系统编码为1001304和3001304(即PYZ酶可变)。该菌种的菌株对所有的抗菌药物敏感，除了一个血培养分离株对红霉素耐药[40]。产氨棒杆菌也可碱化柠檬酸盐，最初分离自人粪便，但从临床材料中未发现过，所以在此处或表29-2中未作其他方面描述[213]。

(48)纹带棒杆菌(*C. striatum*)：纹带棒杆菌是人类皮肤微生物的一部分，但近年来，该菌作为重要的条件致病菌从各种各样的无菌体液、组织和假体装置中被分离出来[4,214]，并被发现是从除眼以外的任何无菌部位中分离出来过的菌[1]。纹带棒杆菌的院内感染或暴发已被报道[215-216]。培养24 h后，纹带棒杆菌菌落呈圆形凸起，表面湿润光泽，奶油状，边缘完整，直径可达1.0～1.5 mm(图29-4d)。纹带棒杆菌可发酵蔗糖，不

一定产酸。API Coryne 系统可识别纹带棒杆菌，但在大多数情况下需要附加试验。纹带棒杆菌菌株 CAMP 反应阳性。然而，纹带棒杆菌的 CAMP 反应通常不如其他 CAMP 试验阳性菌种那么强烈（如耳棒杆菌或解谷氨酸棒杆菌）。MALDI-TOF MS 系统一般能明确鉴定该菌[1,101,111,143]。分离株通常表现出显著的多重耐药性，但迄今为止，已发现对利奈唑胺、万古霉素和达托霉素敏感[40,122]。在治疗过程中对达托霉素产生耐药性已有报道[217]。对临床相关分离株的一篇综述表明，纹带棒杆菌菌株对所有口服抗菌药物均具有耐药性，迫使临床医生必须使用肠胃外抗菌药物[218]。一株尿中分离的多药敏感纹带棒杆菌的 WGS 基因组大小为 2.61 Mb，G+C 含量为 59.4%[219]。

(49)松兹瓦尔棒杆菌（*C. sundsvallense*）：松兹瓦尔棒杆菌从血培养、阴道拭子和腹股沟感染的窦道引流物中分离得到[136,220]。菌落为非亲脂性，呈浅黄色或微黄色，附着在琼脂上，有一定的黏性。革兰染色显示在菌体末端膨大或圆形凸出。该菌缓慢发酵葡萄糖、乳糖和蔗糖。通过 16S rRNA 基因测序发现该菌种和梢氏棒杆菌非常相近，不过 *rpoB* 基因序列分析可以区分它们。抗菌药物敏感性数据很少，但菌株似乎对大多数抗菌药敏感[40]。

(50)梢氏棒杆菌（*C. thomssenii*）：梢氏棒杆菌是一个非常少见的菌种，最初从一个患者的胸腔积液中分离[221]，第二个菌株是从加拿大的环境中获得[136]。该菌种苛氧并缓慢生长，培养 48 h 后直径<0.5 mm，非亲脂性。培养 96 h 后，菌落形态呈磨牙样，有黏性，微黏附于琼脂。梢氏棒杆菌是唯一表达 *N*-乙酰-β-葡糖苷酶活性的棒杆菌属细菌，可从 API Coryne 或 API ZYM 系统观测到。梢氏棒杆菌发酵葡萄糖、麦芽糖，蔗糖并缓慢产酸，在 API Coryne 的编码为 2121125。通过 16S rRNA 基因测序发现该菌种和松兹瓦尔棒杆菌非常相近，不过 *rpoB* 基因序列分析可以区分它们。抗菌药物敏感性数据很少，但菌株似乎对所有抗菌药物敏感[40]。

(51)蒂莫棒杆菌（*C. timonense*）：蒂莫棒杆菌是从心内膜炎患者的血培养中分离得到。它最独特的特征是七叶苷酶反应弱阳性。通过不发酵麦芽糖、蔗糖和 CAMP 反应阴性及测序方法[189]可以与其他七叶苷酶阳性的棒杆菌区分。除红霉素外，菌株对所有测试的抗菌剂均敏感[189]。标准菌株的 WGS 基因组大小为 2.55 Mb，G+C 含量为 66.8%[222]。

(52)结核硬脂酸棒杆菌（*C. tuberculostearicum*）：结核硬脂酸棒杆菌，包括未经验证的“假生殖器棒杆菌”菌株，可归类为一个从未正式发表的分类菌群[223]。几乎所有的“CDC G 群”的细菌可以被分到结核硬脂酸棒杆菌（Bernard，未发表的数据）。不幸的是，实际报道的结核硬脂酸棒杆菌不包括任何一株 CDC G 群细菌[223]。Hinic 等已经描述了该物种的特征[224]。它是条件致病菌，可引起肉芽肿性乳腺炎[1]，也可以从健康成年人的鼻咽中分离[120]。该菌是亲脂性的，一些关键的生化反应，如厌氧生长和发酵果糖可与杰氏棒杆菌区分。该菌可被 MALDI-TOF MS 系统正确鉴定[109,111,143]。结核硬脂酸棒杆菌具有多重耐药性，对红霉素和克林霉素耐药，对青霉素、环丙沙星和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑也有耐药性[40]。

(53)图斯卡尼亚棒杆菌（*C. tuscaniense*）：图斯卡尼亚棒杆菌[此为修正后的名字，原来叫图斯卡棒杆菌（*C. tuscaniae*）]从心内膜炎患者的血培养中分离得到。图斯卡尼亚棒杆菌在厌氧环境中不生长，可与表型相似的极小棒杆菌区分。图斯卡尼亚棒杆菌菌落呈圆形并且规则，而生化反应相似的无枝菌酸棒杆菌菌落干燥，边缘不规则[225]。

(54)溃疡棒杆菌（*C. ulcerans*）：从系统发育型上，溃疡棒杆菌和假结核棒杆菌关系相近，而这 2 个种和白喉棒杆菌最为相关[226]。如前所述，3 种菌都含白喉毒力基因，但溃疡棒杆菌受体结合和 *tox* 基因易位结构域不同，所以溃疡棒杆菌白喉毒素特异性 PCR 可被常规或实时荧光定量 PCR 发现。与这个细菌有关的咽炎很罕见，但如果是分离自假膜性材料中，必须像白喉一样对待[89]。在英国，该菌种已被发现导致了大多数白喉呼吸道病例，而白喉棒杆菌则与大多数皮肤感染有关[64]。已有溃疡棒杆菌从宠物传播至人类并引起显著感染的报道[227]，扩大了白喉类疾病的国际病例范围，其中包括产毒素菌株的溃疡棒杆菌或假结核棒杆菌，这此前在部分国家出现过。个别病例的解决可能需要医学和兽医专家的共同参与。最近对该菌种的特征和由其引起

的感染进行了全面综述[228]。具体处理流程如图29-2所示。

溃疡棒杆菌菌落略干燥，蜡质，灰白色，轻度溶血并在培养24 h后直径达到1～2 mm。溃疡棒杆菌因其具有脲酶活性和CAMP抑制反应可与白喉棒杆菌区分，又可根据其来源、生化及部分*rpoB*基因(而非16S rRNA)序列可与假结核棒杆菌区分。溃疡棒杆菌菌株的糖原、淀粉和海藻糖发酵试验阳性。API Coryne系统和RapID CB Plus鉴定条可以正确鉴定溃疡棒杆菌。MALDI-TOF MS系统可以正确鉴定该细菌[105]，但这种鉴定应与通过*rpoB*测序与假结核棒杆菌进行区分相结合。来自加拿大的分离株对测试的所有药物均敏感[40]。通过WGS预测了潜在的毒力因子，例如磷脂酶D的产生(通过CAMP抑制反应观察到)；菌株的基因组大小范围为2.43～2.61 Mb，G+C含量为53.3%～53.5%[228]。

(55)解脲棒杆菌(*C. urealyticum*)：解脲棒杆菌和尿路感染密切相关[1]。这种细菌常分离自碱性尿，可导致产生鸟粪石晶体。Salem等对该菌的感染和微生物特征进行了全面的综述[229]。与其他的亲脂性棒杆菌一样，该菌落在普通SBA上呈极小，凸起，光滑，灰白色状。解脲棒杆菌严格需氧并具有很强的脲酶活性。商业鉴定系统可以正确鉴定解脲棒杆菌，MALDI-TOF MS系统也是[108,111,143]。该菌几乎都是多重耐药的[40,122,229]，其耐药基因的具体特征已经被阐述[229]。解脲棒杆菌菌株DSM 7109^{T}的WGS基因组大小为2.37 Mb，G+C含量为64.2%。解脲棒杆菌与杰氏棒杆菌非常相近，缺乏脂肪酸合酶基因证实了它们的亲脂性[230]。

(56)快速解脲棒杆菌(*C. ureicelerivorans*)：亲脂性的快速解脲棒杆菌最初分离自血培养中，其最突出的特点是强且快速脲酶活性(60 s)[231]。随后，这种微生物从免疫缺陷患者或消化功能紊乱的患者腹水及血培养中分离得到[232]。通过16S rRNA和部分*rpoB*基因测序分析，这个种最为接近；而快速解脲棒杆菌因具有光滑而非黏稠黄色菌落及快速脲酶活性易于与产黏棒杆菌区分。该菌种的基因组大小为2.28 Mb，G+C含量为64.56%；脂肪酸合酶基因的缺失证实了所观察到的亲脂性[233]。

(57)干燥棒杆菌(*C. xerosis*)：干燥棒杆菌的菌落呈微黄色，干燥，颗粒状，边缘不规则，培养24 h后直径1.0～1.5 mm。必须强调的是，几乎所有干燥棒杆菌在20世纪90年代中期的文献描述中都被误鉴定为无枝菌酸棒杆菌[125]。纹带棒杆菌在过去也被误鉴定为干燥棒杆菌。干燥棒杆菌具有发酵代谢能力，有时能还原硝酸盐，但总是表达α-葡糖苷酶及亮氨酸芳胺酶活性。因为干燥棒杆菌被认为在临床标本中极少遇到，故不包含在API Coryne系统数据库中。API网站提供干燥棒杆菌数字代码为2110325和3110325，得到的结果为“纹带棒杆菌/无枝菌酸棒杆菌”(Bernard，为发表数据)。如前所述，干燥棒杆菌在系统发育型上与弗雷尼棒杆菌和汉森棒杆菌密切相关[170]，若要明确鉴定，则须进行基因检测。干燥棒杆菌ATCC 373^{T}的基因组大小为2.75 Mb，G+C含量为68.7%[234]。

表29-3简要概述了下述分类单元的生化反应特征。

2. 苏黎世菌属 耳炎苏黎世菌几乎只分离自耳部的临床标本[68]，但是该菌种也已经从耳廓脓肿、乳突炎和菌血症中被发现和检测到[17]。经过48h培养，耳炎苏黎世菌形成凸起圆形、白色、奶油状、边缘整齐的菌落，直径为1.0～1.5 mm。触酶阳性，无运动性，具有氧化性。耳炎苏黎世菌的革兰染色形态呈革兰阳性长杆状(图29-1b)。从形态学特征，耳炎苏黎世菌与耳棒杆菌和非发酵棒杆菌非发酵亚种最接近，所有耳炎苏黎世菌具有氧化性，且CAMP试验为强阳性，在API Coryne系统中数字代码是2100004。MALDI-TOF MS系统可以正确鉴别该细菌[109]。某些菌株对β-内酰胺类抗生素MIC值低，部分菌株可能对大环内酯类抗生素和克林霉素耐药。MDR表型的耐药机制已经阐明[17]。

3. 微球菌科(Family Micrococcaceae)

(1)节杆菌属(*Arthrobacter*)和类节杆菌属(*Arthrobacter*-like)：如上所述，自本手册第11版以来，节杆菌属在分类上经历了相当大的变化[18]。节杆菌属和类节杆菌属(作为一个类群，这里统称为节杆菌属)，包括一些极端环境菌株，以土壤和环境为主要定植环境。节杆菌属细菌在培养24 h后，菌落通常呈淡黄色或灰白色，稍有光泽，奶油状有时有点黏滑，直径在2 mm或以上。节杆菌属通常不氧化常见的糖类，但有些在使用同化培

养基条件下或许可以。因此，API Coryne 试条的结果为数字代码 2004，也就是说，该菌明胶酶和触酶呈阳性，但不利用糖。部分节杆菌属细菌是有动力的，而短杆菌一般是无动力的。和短杆菌属一样，节杆菌属表达 DNA 酶且有明胶酶活性，有时候脲酶和七叶苷水解呈阳性[36,235]。在种的水平上对节杆菌属的鉴定最好由参考实验室采用分子鉴定及其他方法来实现。利用 MALDI-TOF MS 系统准确鉴定医学相关菌种的报道很少，尽管 Bruker 生物型系统中包含了 40 多个种的 1 个或 2 个光谱。抗菌药物敏感性数据很少，据 Mages 等报道，大多数（>95%菌株）节杆菌对头孢噻肟、多西环素、庆大霉素、利奈唑胺、美罗培南、青霉素、利福平和万古霉素敏感，有些菌株对环丙沙星和红霉素不敏感[36]。节杆菌属的物种是罕见的机会性人类病原体，自本手册第 11 版以来已经历了重大的分类学修改。

与人类感染相关的广义的节杆菌（*Arthrobacter sensu lato*）菌种类如下（括号中为分离源）：黄体节杆菌（*A. luteolus*）（伤口培养）、米节杆菌（*A. oryzae*）（颈部脓肿）、血液节杆菌（*A. sanguinis*）（血培养）和沃氏节杆菌（*A. woluwensis*）（心内膜炎和血培养）[36,236-238]。从人类感染中分离出的谷氨酸杆菌（*Glutamicibacter*）包括肌萎缩谷氨酸杆菌（*G. creatinolyticus*）（血症和血培养）（Bernard，未发表数据）[239]、迈索尔人谷氨酸杆菌（*G. mysorens*）（有红斑皮肤）[240]和原虫谷氨酸杆菌（*G. protophormiae*）[36]。从血培养中分离到的固氮白芍杆菌（*Paenarthrobacter nitroguajacolicus*），通过 16S rRNA 基因测序，与冬青白芍杆菌（*P. ilicis*）和变金黄白芍杆菌（*P. aurescens*）关系最接近（约 99%同源性）（Bernard，未发表数据）。与这里描述的大多数其他菌种相比，氧化假关节杆菌（*Pseudarthrobacter oxydans*）的感染更为常见[36,238]，偶发性感染涉及其他菌种，如从皮肤病患者肿胀的硬结中分离的硬结假关节杆菌（*P. scleromae*）[241]和从伤口中分离的食砜假关节杆菌（*P. sulfonivorans*）（Bernard，未发表数据）。从节杆菌是条件致病菌的临床材料中，包括尿、耳部感染、羊水、伤口、子宫颈炎、血培养和气管分泌物，更经常地分离到了卡氏假谷氨酸杆菌（*Pseudoglutamicibacter cumminsii*）[36,242]。16S rRNA 基因测序发现，卡氏假谷氨酸杆菌与白色假谷氨酸杆菌（*P. albus*）密切相关（同源性为 99.2%），它们无法通过 MALDI-TOF MS 进行区分，但是对去铁胺的抗性可以鉴定出从感染的植入式心脏复律除颤器中分离的白色假谷氨酸杆菌菌株[243]。在这个病例中，白色假谷氨酸杆菌对万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺和阿莫西林敏感，但对环丙沙星和庆大霉素有抗药性。替考拉宁和口服氨苄西林对感染有作用。

（2）耳炎杆菌属（Genus *Auritidibacter*）：怠惰耳炎杆菌（*Auritidibacter ignavus*）分离自耳感染中。该菌为革兰染色阳性杆菌，可观察到杆球循环。菌落呈米色且光滑，该菌在大多数常用底物中不具反应性。如果用悬滴法检测，细菌具有运动性。抗菌药物敏感性数据有限，但 Yassin 等经纸片扩散法检测，该菌株对氨苄西林、头孢唑林、克林霉素、苯唑啉、青霉素和万古霉素敏感，G+C 含量为 59.7%[19]。

（3）罗氏菌属：罗氏菌属目前包含 6 个有效命名的种，其中 3 个与临床相关：黏滑罗氏菌（之前为黏滑口腔球菌，在第 22 章中有描述）[20]；龋齿罗氏菌，2004 年修正[132]，最初与口腔微生物群有关；气罗氏菌，最初从环境中分离到[21]，现已从许多临床标本中分离到[244]。以前被认为是 CDC 棒杆菌 4 组的部分菌株已被证明是典型的龋齿罗氏菌[132]。这些灰黑色的细菌主要分离自呼吸道标本、脓液或血培养（图 29-4h），相比之下，带黑色的金色黏液棒杆菌主要分离自女性泌尿生殖道（图 29-4g）。这 3 种菌已被发现占健康志愿者唾液可培养菌群的 0.8%～5.9%，使用选择性培养基可提高它们的分离率，因此，当这些菌从患者身上发现时，必须仔细评估临床相关性[67]。从梅奥诊所的患者中分离的约 37%的罗氏菌在 10 年内被认为具有临床相关性，最常见的是血液病患者[245]。尤其是龋齿罗氏菌与牙菌斑、牙周病和机会性感染有关，包括特别是牙周病后的心内膜炎、眼内炎、腹膜炎、菌血症/败血症及心内膜炎后的骨髓炎[246]。

龋齿罗氏菌和气罗氏菌革兰染色阳性，呈颗粒状、球形或杆状至丝状。龋齿罗斯菌培养 48 h 后，菌落呈典型的白色（或较少见的灰黑色）、凸起，光滑或粗糙或呈“轮辐车轮”状（图 29-4f），直径达 2 mm。罗斯菌通常在富含 CO_2 的环境中生长较好。罗氏菌有一个可变的触酶反应，无运动

性和可发酵的。气罗斯菌菌落年轻时呈乳白色，光滑，但随着年龄的增长，菌落变干、折叠并黏附在琼脂上。API Coryne 系统不能正确区分龋齿罗氏菌和气罗氏菌，后者以前已经通过分子方法鉴定过（Bernard，未发表的数据）。MALDI-TOF MS 系统能正确鉴定龋齿罗氏菌[143]。近期研究的抗菌药物敏感性数据有限。部分龋齿罗氏菌对氨基糖苷类的 MIC 值高，而青霉素对罗氏菌的体外活性良好。在一项研究中，菌株对包括万古霉素在内的大多数药物敏感[245]。药敏试验时，龋齿罗氏菌因过于黏稠或在空气中生长不佳，结果不可靠。

4. 短杆菌科 短杆菌属：部分短杆菌属细菌是人类皮肤的微生物，而另一些已从食物、环境或动物中被发现[78]。细菌经 24 h 培养，菌落从黄色和浅黄色到灰白色、凸起且大多滑腻，直径 2 mm 或以上。和其他短杆菌相比，从耳样本中分离的麦克布瑞德短杆菌（*B. mcbrellneri*）的菌落形态更加颗粒状且更干燥。革兰染色显示短杆状，当菌变老时（培养 3 天后）可能转变成球形。短杆菌触酶和氧化酶呈阳性，与临床相关的短杆菌无动力，耐盐（6.5% NaCl）。乳酪短杆菌是该属中最常见的菌，其他菌种为稀有致病菌[78,247-248]。由乌鸦短杆菌（*B. ravenspurgense*）和马赛短杆菌（*B. massiliense*）引起的临床病例感染包括泌尿道感染、菌血症和脚踝伤口。该菌对青霉素、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢曲松、美罗培南、万古霉素、达托霉素，利福平、奎奴普丁-达福普汀和利奈唑胺敏感。对环丙沙星、红霉素和克林霉素具有中等或耐药性，对庆大霉素，四环素和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑具有可变性[23,248]。MALDI-TOF MS 系统准确地鉴定了该属的几个种[23,111]。修正后的 *B. ravenspurgense* 的 WGS 基因组大小为 2.28～2.41 Mb，G+C 含量为 62.3%～62.4%[23]。

5. 纤维单胞菌科

(1)纤维单胞菌属：人纤维单胞菌（*Cellulomonas hominis*）和丹佛纤维单胞菌（*C. denverensis*）是到目前为止仅有的 2 种从临床感染中分离出来的纤维单胞菌，通常来自环境[24]。这些菌已从藏毛囊肿、心内膜炎、脑脊液和菌血症中发现过。马赛纤维单胞菌（*C. massilensis*）分离自一个健康的塞内加尔人的粪便[26]。菌落最初呈白色或暗或亮的黄色，但 7 天后几乎所有纤维单胞菌都有略带黄色。细菌培养 24 h 后，菌落直径在 0.5～1.5 mm 之间，呈凸起黏滑，且具有完整边缘，但与厄氏菌不同，不含基内菌丝[25]。革兰染色显示细小的杆状。触酶阳性，具有可变的运动性，并且具有发酵性。医学相关的菌种丹佛纤维单胞菌 D-山梨糖醇发酵试验阳性而区别于人纤维单胞菌（*C. hominis*）[25]，大部分纤维单胞菌表达纤维素酶活性[24]。使用 MALDI-TOF MS 系统来鉴定这些菌有局限性，内部开发的光谱可用于检测 *C. Massilensis*[26]。临床相关菌株对四环素、利福平、万古霉素、克拉霉素、克林霉素、亚胺培南和米诺环素敏感[249]。

(2)厄氏菌属：厄氏菌的革兰染色显示球杆状的细菌，其起源于假菌丝的裂解。厄氏菌为需氧或兼性厌氧菌，触酶阳性，具有可变的运动性，属发酵型[30]。骚动厄氏菌，一种十分罕见的人类致病菌，通常来自环境（如土壤）。细菌经 24 h 培养后，菌落呈淡黄色至磷黄色，凸起，黏滑；其可以渗透到琼脂，产生基内菌丝，有时称为假菌丝，直径达 1～2 mm（图 29-4j）。骚动厄氏菌能快速发酵糖类产酸；其也表现出强七叶苷反应。骚动厄氏菌能液化明胶但不水解其他底物。关于使用 MALDI-TOF MS 系统进行鉴定的信息很少。

6. 皮杆菌科

(1)皮杆菌属：人皮杆菌是人类皮肤的微生物，也可引起菌血症，伤口、眼部和皮肤感染，与透析有关的腹膜炎、脓肿和骨髓炎[250]。细菌经 48 h 培养，菌落呈白色、凸起且黏滑状，直径为 1.0～1.5 mm（图 29-4e）。革兰染色结果显示特异的球杆状或球状（图 29-1c）。菌株触酶阳性，氧化酶阴性，无运动性，具有发酵性。它是唯一触酶阳性的棒杆菌[除了新放线菌（*Actinomyces neuii*）]且能使赖氨酸和鸟氨酸脱羧[31]。从手指坏死中分离的金雀皮杆菌（*D. jinjuensis*）[32]和从阴道液中分离的阴道皮杆菌（*D. vaginalis*）[33]与人皮杆菌在生化特征上相似。如前所述，通过 16S rRNA 基因测序结果表明，这些细菌也有密切的进化关系，3 种菌的 G+C 含量相似，均为约 62.5%。研究表明，MALDI-TOF MS 系统可以鉴定人皮杆菌[109,111,143]。人皮杆菌菌株对氯霉素、环丙沙星、克林霉素、红霉素、庆大霉素和四环素耐药，对青

霉素有中度敏感性，但对头孢菌素、利福平、替考拉宁和万古霉素敏感[251]。在人皮杆菌的MDR菌株上发现的耐药决定因素与在多耐棒杆菌中发现的相似[34]。

（2）短状杆菌属（*Brachybacterium*）：短状杆菌属在37℃下生长，呈革兰阳性的球状和杆状。菌落小，白黄色，突起，光滑。无运动性，基本上是需氧的，在微需氧条件下生长较差，菌株触酶阳性但氧化酶阴性。菌株具有发酵性。G+C含量为68%～73%[252]。

（3）创伤杆菌属（*Helcobacillus*）：创伤杆菌属包含马赛创伤杆菌（*H. massiliensis*）一个种，其表型类似人皮杆菌。在SBA培养基上培养24 h，菌落呈圆形，白色（成片），有光泽，直径为1 mm。细菌为革兰阳性短杆状。触酶阳性，无运动性，具有发酵性，基本上是需氧的。但当使用API Coryne或API 50CH板基质时，马赛创伤杆菌（*H. massiliensis*）通过发酵赤藓醇、阿拉伯糖、木糖、肌醇和甘露醇及硝酸盐还原试验这几个关键的反应与人皮杆菌区分。标准菌株对阿莫西林、万古霉素、利福平、多西环素和庆大霉素敏感，对红霉素中度敏感[37]。

7. 原小单胞菌科(Promicromonosporaceae)

纤维微菌属：纤维微菌是一种罕见的条件致病菌，纤维纤维微菌（*C. cellulans*）与菌血症、化脓性关节炎和其他感染有关[28,253-254]。类似地，芬氏纤维微菌（*C. funkei*）也从腹膜炎和细菌感染中被发现[255]。这2个菌的16S rRNA基因序列非常接近，因此已经概述了区分这2个菌的关键生化试验[255]。在年轻的培养基中，产生的"菌丝体"会分裂成不规则的、弯曲的和棒杆状。触酶阳性，菌株具有运动性或无运动性，并且具有发酵代谢[256]。培养24 h，菌落呈黄色，直径为1～5 mm；它们与狭义上的骚动厄氏菌（*O. turbata sensu stricto*）相似，能渗透琼脂生长。此外，纤维化纤维微菌表现出与骚动厄氏菌十分相似的生化筛选类型（表29-3）；应使用基于分子鉴定的方法进行最终鉴定。菌株LMG 16221^{T}的WGS基因组大小为4.28 Mb，G+C含量为74.3%（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/15565?genome_assembly_id=202276）。全基因组测序后预测了纤维纤维微菌毒力和其他因子[38]。

8. 微杆菌科

（1）微杆菌属：从临床标本分离的微杆菌属绝大部分是黄色棒杆菌，原来归于金杆菌属（*Aureobacterium*）中。黄色从发白到亮黄至橙色。大部分菌株触酶阳性，但也可能观察到触酶阴性菌株。部分微杆菌属能在厌氧条件下生长但生长较弱。微杆菌属有动力，且动力可变。发酵甘露醇和木糖及硝酸盐还原可以作为有意义的生化试验来区分这个属和其他属[257]，仅仅通过表型分析几乎不可能准确鉴定到种，最终鉴定到种水平需要由分子生物学方法，然而，一些种仅仅靠16S rRNA基因测序无法获得鉴定[39]。临床标本中最常分离到且确认的微杆菌属包括氧化微杆菌（*M. oxydans*），副氧化微杆菌（*M. paraoxydans*）和叶片微杆菌（*M. foliorum*）[39]。在一篇加拿大的综述中，这些种及产左聚糖微杆菌（*M. laevaniformans*）常获得分离[40]。

微杆菌已被发现是多重耐药菌，因此，建议对每一个临床相关菌株进行抗菌药物敏感性试验。值得注意的是，在69株被检测的加拿大菌株中，26%对万古霉素耐药，71%和90%对美罗培南和达托霉素不敏感，但全部或大部分对利奈唑胺、利福平、庆大霉素、四环素和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑敏感[40]，与Gneiding等报道的结果相似[39]。

（2）短小杆菌属（*Curtobacterium*）：革兰染色显示，短小杆菌是一种小的、不规则的短杆状菌，没有分枝，在较老的培养基中浓缩成球形[80]。触酶阳性，在大多数菌株中观察到运动性，并且所有菌株在氧化碳水化合物中缓慢地进行呼吸代谢。与大多数微杆菌不同的是，其发酵糖类产酸的速度非常缓慢（4～7天）[42]。短小杆菌属硝酸盐还原试验阴性，但七叶苷水解反应强。短小杆菌属种水平的区分非常困难，只能参考实验室应用分子的方法进行。G+C含量在65%～75%之间。据报道，短小杆菌属细菌对万古霉素、大环内酯类和利福平MIC较低[42]。

（3）雷弗森菌属（*Leifsonia* 属）：水生雷弗森菌（*Leifsonia aquatic*）菌落缓慢（3～4天）形成黄色色素。革兰染色显示细长、不规则的杆状或细丝。老了以后形态可能是球菌。菌株触酶阳性，氧化酶可能是阳性的（棒杆菌的一个非典型特征）。运动性（如果观察到）是通过均匀分布的鞭毛来实现的；菌株是氧化物[258]。分离的菌株可能

对万古霉素耐药，因此临床相关分离株应进行 AST 检测[45-46]。

（4）微杆菌科其他医学相关菌属（农杆菌属、犬杆菌属、白杆菌属和假棍状杆菌属）和间孢囊菌科（两面神菌属和诺尔菌属）：目前没有基于这些医学相关菌株的综合性生化反应、MALDI-TOF MS 和其他数据，因此这些属不包含在表 29-3 中，仅在上面（“分类学”）讨论。

9. 芽胞杆菌目（还未分类到科） 微小杆菌属：微小杆菌，包括乙酰微小杆菌（*E. acetylicum*）的潜在致病性很低。乙酰微小杆菌分离自不同来源标本（如皮肤、伤口和脑脊液）[102]。目前已有报道乙酰微小杆菌引起假性菌血症。乙酰微小杆菌经 24 h 培养后，菌落光滑、金黄色至橙色，直径达 2 mm。在新鲜的培养基中，微小杆菌以短杆状或球状形式存在，在老的时候可能呈长的扭曲的杆状。菌株一般触酶阴性，且大多数是氧化酶阳性的。有运动性的菌株一般具有周生鞭毛，有发酵代谢能力[259]。能快速发酵糖类产生酸，除木糖外。如果只做生化试验，菌株可能和微杆菌属混淆，鉴定应通过分子方法进行确认。国际参考中心十几年共分离到 6 例来自血培养的金橙黄微小杆菌（*E. aurantiacum*），氧化酶阴性，DNA 酶和木糖阳性或可变阳性，Etest（生物梅里埃）试验表明细菌对所有药物敏感[56]。

10. 放线菌科 隐秘杆菌属和储珀菌属（*Trueperella*）：3 种医疗相关的细菌，溶血隐秘杆菌（*A. haemolyticum*）、化脓储珀菌（*T. pyogenes*）和伯纳德储珀菌（*T. bernardiae*）均为触酶阴性，无运动性且在 SBA 中呈 β-溶血。所有种均显示发酵葡萄糖代谢。所有菌株在富含 CO_2 条件下生长并表现出溶血反应。

隐秘杆菌的标准菌种，溶血隐秘杆菌在 37℃ 培养 48 h 后，菌落直径达 0.5 mm。鉴定溶血隐秘杆菌最主要的是 CAMP 抑制试验（图 29-3a）。主要负责蛋白质是由溶血隐秘杆菌产生的磷脂酶 D，这种蛋白质与溃疡棒杆菌和假结核棒杆菌表达的蛋白在基因型和功能上相似。

储珀菌属细菌在 CAMP 试验中无反应[60]。化脓储珀菌是储珀菌属中菌落体积最大的，其培养 48 h 后直径达 1 mm。该菌在 SBA 上也显示了清晰的 β-溶血区。与溶血相关的蛋白质命名为溶血素（pyolysin），也是体内重要的毒力因子。革兰染色显示化脓储珀菌呈分枝杆状。化脓储珀菌是唯一表达 β-葡糖醛酸糖苷酶活性的医学相关的隐秘杆菌属/储珀菌属细菌，且能发酵木糖。

伯纳德储珀菌[60]经过 48 h 培养后，菌落呈透亮、白色，直径<0.5 mm。部分菌落为奶油样，而其他为黏性。革兰染色显示其呈相对较短的无分枝杆状。大部分伯纳德储珀菌株属于少数可发酵糖原的棒杆菌。伯纳德储珀菌菌株的另一特征是发酵麦芽糖产酸的能力高于葡萄糖。

溶血隐秘杆菌和储珀菌属细菌对所有 β-内酰胺类抗生素、利福平和替加环素的 MIC 值都很低，而氨基糖苷类和喹诺酮类的活性在降低。大环内酯类抗生素活性很高且在治疗感染时可代替 β-内酰胺类抗生素。目前，已有 β-内酰胺类抗生素在细胞内无作用导致 β-内酰胺类抗生素治疗失败的报道。

十、分型系统

对苏联各加盟共和国和其他地区暴发流行的白喉棒杆菌进行了研究，包括全细胞多肽分析，全基因组限制性片段长度多态性分析，核糖体分型，脉冲场凝胶电泳，PCR 单链构象多态性，*tox* 和 *dtxR* 分析及 16S～23S rRNA 间隔区，片段长度多态性的扩增，多态性 DNA 的随机扩增和多位点酶电泳[260]。使用限制性内切酶 BstEII 的白喉棒杆菌核糖体分型的国际数据库在 2004 年已经建立[261]。基于对 7 个管家基因的序列进行分析的多位点序列分型标准已经成熟[146]。该种方法被有效地用于加拿大温哥华流浪者中引起皮肤感染的白喉棒杆菌（*C. diphtheriae*）菌株[84]，研究南非暴发的菌株[88]，以及对提交给澳大利亚参考中心的菌株进行鉴定[262]。多位点序列分型技术也被成功地应用于麦氏棒杆菌和类似麦氏棒杆菌菌株的暴发流行调查[186]。MLST 方法还被用于发现了一株引起 70 岁女性呼吸性白喉的溃疡棒杆菌（*C. ulcerans*），与患者的宠物犬携带的菌株有关[227]。WGS 现已成为疫情调查的标准方法。Meinel 等使用该方法调查居住在瑞士和德国难民营中的非洲和叙利亚难民中的皮肤白喉棒杆菌（*C. diphtheriae*），能够分辨率极高地鉴定出患者中 3 个主要克隆菌[87]。对白喉棒杆菌基因组特征

的仔细分析，为与该病原菌相关的多样性和毒力因子提供了大量信息[263]。用该标准方法比较了杰氏棒杆菌菌株之间的基因组水平差异[174]。这些分型方法偶尔也用于其他棒杆菌属细菌，如脉冲场凝胶电泳已被用于溶血隐秘杆菌的临床研究[264]。

十一、血清学试验

检测针对白喉毒素的抗体是白喉棒杆菌唯一制定的血清学试验。使用 Vero 细胞培养系统进行毒素中和测定方法被酶免疫测定法所取代。在血清，抗体水平≥0.1 U/ml 认为对身体有保护作用，<0.01 U/ml 意味着宿主是易感的，在 0.01～0.10 U/ml 水平表示个体局部免疫。据报道，只有 30%的美国成年人(60～69 岁)存在预防性抗体(≥0.1 U/ml)(https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5517a1.htm)。这可能引起潜在公共健康风险并导致疾病的再度发生。在近期欧洲[266]、中国[267]和塔吉克斯坦[268]的血清流行病学研究中该情况被反复重申。每隔十年需要加大类毒素的剂量，以便在儿童免疫完成后保持保护性免疫。

十二、抗菌药物敏感性试验

对每种细菌的描述都给出该种细菌的抗菌药物敏感性状况。由于棒杆菌在每个感染病例中对抗菌药物的敏感性都是不确定的，具有临床意义的菌株都应该进行药敏试验(见上文"临床意义")。由于万古霉素耐药革兰阳性细菌的出现，例如多耐微杆菌和该属中约 26%的其他菌种，糖肽类作为治疗棒杆菌感染的一线药物已经不适合。正如本章其他部分所描述的，迄今为止许多国家对棒杆菌所有菌株的药敏试验仍都是对万古霉素、利奈唑胺和达托霉素敏感的[40]。

临床实验室标准委员会已经发表关于使用微量肉汤稀释法检测棒杆菌药敏试验的试验条件和解释说明[269]。调菌液至 0.5 麦氏标准，菌液接种至含 2%～5%(vol/vol)溶解的马血并经过阳离子校正的 M-H 平板，35℃空气中培养 48h。MIC 的解释类别目前已包括 16 种抗生素。目前使用微量肉汤稀释法，已确定对 4 种或者更多抗生素(共 16 种测定的类别)的多重耐药，如部分或大多数无枝菌酸棒杆菌、杰氏棒杆菌、解脲棒杆菌、多耐棒杆菌、结核硬脂酸棒杆菌、纹带棒杆菌及典型的由某个国家收集培养的非发酵棒杆菌和金色黏液棒杆菌[40]。EUCAST(www.eucast.org)还提供了与棒杆菌属相关的抗生素的操作规程、折点和解释标准，用于 MIC 及纸片扩散测定。许多 MIC 数据是使用 Etest 法在含 5%羊血的 M-H 琼脂上进行的。

十三、评价、解释和结果报告

有关鉴定棒状细菌种水平的准则(参见"临床显著性")也适用于评估和解释培养结果，即一旦鉴定了棒状细菌至种水平，结果应立即报告。

(一)白喉棒杆菌、溃疡棒杆菌和假结核棒杆菌(引起白喉的菌种)

若临床怀疑分离物为引起白喉的 3 种菌种之一，处理如图 29-2 所示。

(二)棒杆菌(非引起白喉的菌种)和棒状细菌

棒状细菌成为优势菌或在单一培养基中反复分离到，表明该细菌与患者的疾病有病原学的关系，应进行调查。如果血液培养棒状细菌阳性，应报告给患者的主治医生，并且报告该棒状细菌的临床意义，棒状细菌是否阳性需要微生物室与医生的合作，并进行仔细检查。以笔者的经验，2 个血培养出现 1 个阳性，或 3 对需氧瓶和厌氧瓶阳性的案例几乎没有临床意义(除了在治疗心内膜炎的情况下)。必须注意的是，当血液培养的判读结果有一半或以上标本呈棒状细菌阳性时，尤其是亲脂性棒状细菌阳性时，由于并非所有血液样品都取自心内膜炎患者，导致亲脂性棒杆菌可能最终呈现假阳性。

另一方面，当棒状细菌在非无菌场所生长，菌群数量等于或小于其他菌群时，棒状细菌应重新报告为"正常菌群"。建议平板上细菌培养至少 72 h 后丢弃，以便有机会回顾性评估细菌。

十四、附录

(一)双歧杆菌科,加德纳菌属

加德纳菌属(目前只有阴道加德纳菌一个菌种)与本章中描述的其他菌属没有密切的联系。通过对双歧杆菌属的系统发育分析,它被归为双歧杆菌科,是因为与双歧杆菌属有较远的亲缘关系。阴道加德纳菌的细胞壁超微结构研究表明,它具有与其他革兰阳性菌相似但极薄的细胞壁结构(即有一个较小的肽聚糖层)。G+C含量为42%~44%,比本章中描述的任何一个其他属细菌都低。革兰染色显示细小的可变棒或球杆菌(图29-1d),其不产生触酶,细胞无动力,进行缓慢的发酵代谢[270]。

(二)流行病学与传播

阴道加德纳菌是女性(有或没有细菌性阴道病),特别是育龄妇女内源性阴道菌群的一部分。阴道加德纳菌生长的最佳pH为6~7之间,在阴道中较高的pH条件下生长。此细菌也能在细菌性阴道病(BV)女性患者的男性伴侣的尿道分离到。

(三)临床意义

近年来,BV已成为宏基因组学和其他前沿方法研究的热点。良好的阴道健康与乳杆菌属细菌和其他产乳酸细菌的定植有关。它们能抑制病原菌的定植,并与阴道微生态有关。相比之下,BV至少与以下4个因素有关:①阴道可被阴道加德纳菌和各种厌氧菌广泛地定植;②大量的阴道加德纳菌定植与阴道黏膜上皮完整性的破坏有关;③阴道加德纳菌的存在与阴道黏膜愈合能力下降有关;④阴道加德纳菌产生的物质可阻止黏膜愈合,而惰性乳杆菌分泌的物质有助于黏膜伤口的修复;这些细菌分泌物的作用机制仍在研究中[272]。

全球女性的BV发病率为4%~58%,妇女感染阴道加德纳菌的后果包括早产、产后子宫内膜异位、盆腔炎、上生殖道感染及增加对性传播感染(特别是HIV感染)的易感性[272]。与生殖道或产科有关的原因相比,涉及严重感染(败血症,伤口感染)的情况非常罕见,但目前也有包括男性感染的报道[273]。

(四)样本的采集、转运和储存

阴道或阴道外的样本可用棉拭子采集。如有必要,最好像做流行病学研究那样,取一个拭子直接镜检,另一个拭子用于培养。如果不能直接接种培养基,应将拭子置于运输培养基(如Amies培养基)中,并在24 h内接种。应注意,阴道加德纳菌对聚茴香磺酸钠(SPS)敏感,因此,当怀疑阴道加德纳菌感染时,应使用无SPS培养基(或添加明胶的SPS培养基)以从血培养系统中获得最佳培养效果。

(五)直接检测、分离、鉴定

诊断BV的金标准是直接检查阴道分泌物而非培养阴道加德纳菌,因为阴道加德纳菌从健康女性标本中也能分离得到[274]。BV检测是检查阴道分泌物,以检测典型的"鱼腥样"三甲胺气味,这种气味在滴加10%KOH碱化后增强(但阴道加德纳菌不产胺)。BV患者阴道分泌物的典型涂片呈"线索细胞"(细菌覆盖在上皮细胞边缘),且与大量小的革兰阴性厌氧菌(主要是普雷沃菌属和卟啉单胞菌属)和革兰染色不定(阴道加德纳菌)杆菌及球杆菌组成的细菌群混合,但一般不包括乳杆菌。有人推荐应用标准化的革兰染色解释说明以提高该方法的再现性[272]。尽管不推荐常规实验室程序,阴道加德纳菌的分离同样支持BV的诊断。阴道拭子培养在vaginalis琼脂上(制备方法见第20章)且应该半定量地划成一个环。培养于35~37℃且含5% CO_2 环境中或在烛罐中。含人血或兔血的平板上可观察到轻度β-溶血,但在SBA上无(阴道加德纳菌在SBA上也能生长,表现出α-溶血)。培养24 h后查看平板,可观察到直径<0.5 mm β-溶血菌株的生长,但很多时候阴道加德纳菌在48 h后观察最佳。可疑菌株的革兰染色可确诊阴道加德纳菌。

阴道加德纳菌均有α-葡糖苷酶,水解淀粉且脯氨酸氨肽酶阳性,但只有90%的阴道加德纳菌能水解马尿酸盐。API Strep和API Coryne系统均能较好地鉴定阴道加德纳菌[64]。MALDI-TOF MS系统能准确鉴定该细菌[275]。在临床材料中直接检测该菌的方法多种多样,包括自制核酸扩增法、确认VPⅢ检测法和DNA荧光原位杂交法[276]。

(六)抗菌药物敏感性

甲硝唑是BV局部治疗及系统治疗由BV相关细菌群引起的外阴感染的药物。仅由阴道加德纳菌引起的全身感染可以使用氨苄西林或阿莫西林治疗,目前为止尚未发现产β-内酰胺酶的阴道加德纳菌。一般不建议阴道加德纳菌的常规药敏试验。

参考文献请扫二维码查阅

第30章 诺卡菌属、红球菌属、戈登菌属、马杜拉放线菌属、链霉菌属及其他需氧放线菌

PATRICIA S. CONVILLE, BARBARA A. BROWN-ELLIOTT, FRANK G. WITEBSKY

（白志宇 译；孙自镛、刘文恩 审校）

一、分类

放线菌(actinomycete)的英文单词由希腊语词根 *actino*-和-*mycete* 组成，*actino*-意为光线、射线(因而也称为"杆")，-*mycete* 意为真菌。目前需氧放线菌微生物和已划归到放线菌属(the genus *Actinomyces*)中的厌氧菌，由于具有相同的显微和菌落形态特征，曾认为存在相互关联而一起统称为"需氧放线菌"。作为一个微生物组群，虽然尚未就需氧放线菌达成一致性的可操作性定义，但现已明确其为进化程度各不相同属的集合。需氧放线菌在某个生长阶段均可呈现革兰阳性杆状，且在一定生长条件下，大多数常见分离菌种至少显示初步分支。除了新近描述的劳森菌属(*Lawsonella*)，所有需氧放线菌在有氧环境下比无氧环境下生长得更好，该特征可将需氧放线菌与放线菌属大多数微生物区别开来。由于劳森菌属显示出许多其他需氧放线菌表现出的特性，包括部分耐酸性，该种属将在本章进行讨论。参照《原核细胞生物名称目录》(*the List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*)(LPSN，http://www.bacterio.net/)分类，本章中所涵盖的需氧放线菌当前的属分类如图30-1所示。

根据分子遗传学研究，细胞壁中含有分枝菌酸(*mycolic acids*)的微生物所在的属，包括迪茨菌属(*Dietzia*)、戈登菌属(*Gordonia*)、诺卡菌属(*Nocardia*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、慢反应脂肪酸菌属(*Segniliparus*)、冢村菌属(*Tsukamurella*)和威廉姆斯菌属(*Williamsia*)7个属，具有相当密切的亲缘关系[1-2]。与其他不含分枝菌酸的需氧放线菌属相比，这些富含分枝菌酸的属与棒杆菌属(*Corynebacterium*)和分枝杆菌属(*Mycobacterium*)(有时这两个属被认为是需氧放线菌)显示出更近的亲缘关系。按照最新的分类方案，前述7个属以及棒杆菌属和分枝杆菌属均归属于棒杆菌亚目(*Corynebacterineae*)(LPSN)。在图30-1中，棒杆菌亚目各属至少具有弱抗酸性，但棒杆菌属、威廉姆斯菌属除外，迪茨菌属不定。

已识别的致病性需氧放线菌菌种数量迅速增加，但本章只讨论那些已证实有临床意义的菌种所在的属。遗憾的是，随着研究不断深入，细菌种间差异越来越小，使得描述它们在地理分布、致病性和其他生物学机制，以及与疾病的关联性、抗菌药物敏感性模式等方面的重要种特异性差别越来越困难。与人类疾病相关菌种的大量出现也给临床微生物学家带来几个难题。第一，表型试验用于种的准确区分几乎毫无用处，特别是对于需氧放线菌，临床实验室(包括大多数研究实验室)中可用的表型试验项目太少，不足以用于准确区分如此多的菌种，而且，给定菌种的特异性反应阳性率通常也不清楚。此外，确切而言，同一生化试验通常也不可能应用于所有菌种，使得不同研究结果缺乏可比性。第二，某些类型的试验，如细胞壁成分分析和全细胞糖分析，仅少数研究机构可以完成，对种水平的鉴定极少有用。因此，本章只提供某些表型特征的一般信息，具体操作程序和其他细节可查阅参考文献。第三，目前基因测序具有足够的区分能力和重现性，是临床实验室最有效的菌种准确鉴定方法。第四，基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser de-

sorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)法可以鉴定某些菌种,但只有在相关数据库经过充分验证时,此方法才具有足够敏感性。第五,菌种准确鉴定问题越来越突出,临床文献充斥着错误鉴定,有关诺卡菌属的错误鉴定最为明显。另外,由于某些菌种仅依赖单个菌株进行描述,还有一些仅有少量报道,导致几乎无有意义的临床信息能与具体的菌种联系起来。尤其是当分子学方法不可用时,不太可能得到分离株的准确鉴定结果,因此,鉴定也不可能有实际的临床效用。

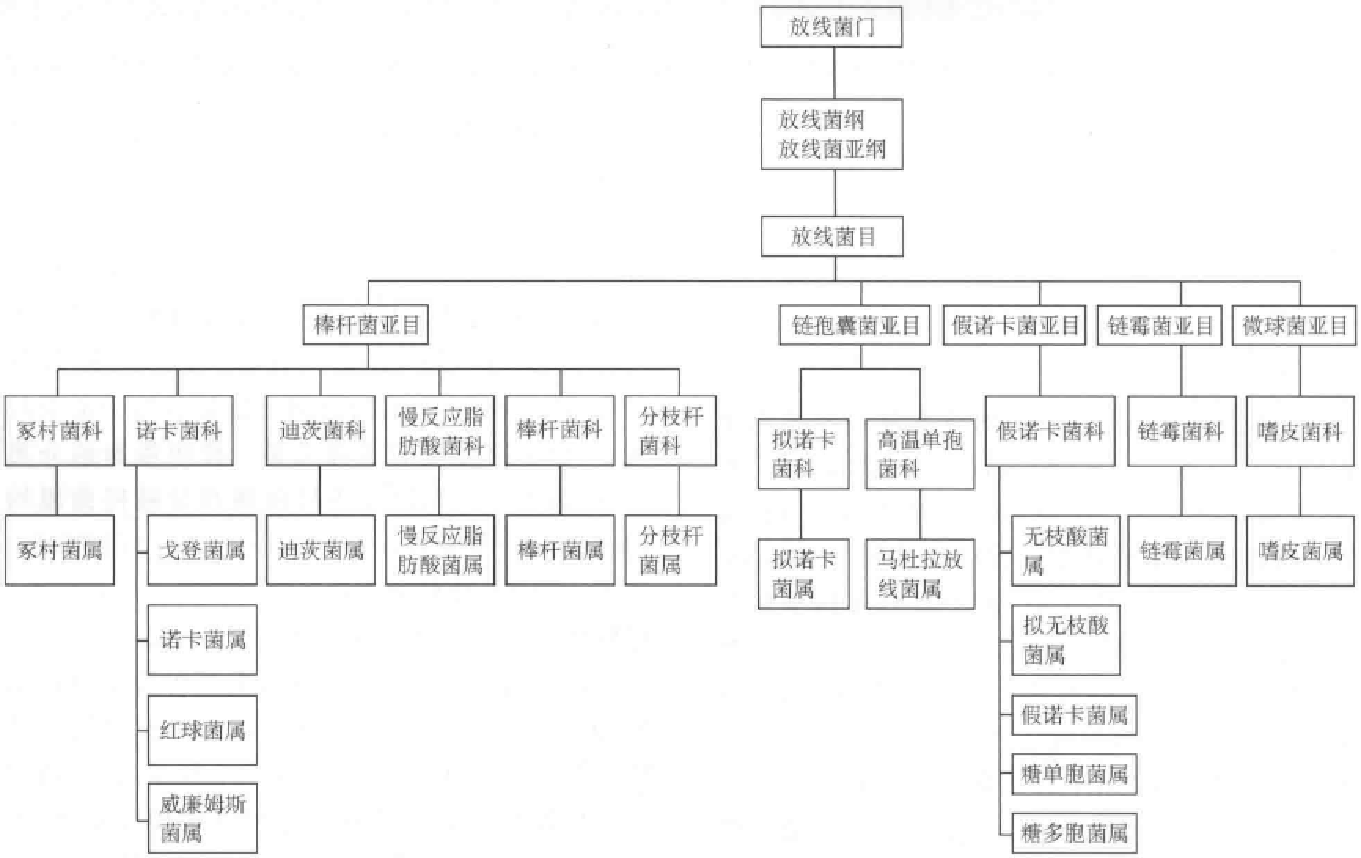


图 30-1 人类致病性需氧放线菌分类(未含高温放线菌科致病菌),信息来源于 LPSN(http://www.bacterio.net/)

有些术语虽然适用于所有细菌,但是用于需氧放线菌时,特别容易引起混淆。首先,对每个菌种而言,仅有一株"模式菌株(type strain)",即其所在种的初始描述所依据的菌株。作为赠予模式菌株(given type strain)收藏在各菌种保藏中心的属于相同菌种的其他菌株称为"参考菌株(reference strains)",但它们不是模式菌株。其次,术语"sensu stricto"为拉丁语,意为"严格意义上",当该词和菌种名称一起使用时,应严格限定为意指采用目前可用的最好的鉴定方法鉴定属于特定种的微生物。例如,如果表述为"严格意义上的星形诺卡菌(*Nocardia asteroides sensu stricto*)"分离株,就应意味着该菌株经过基因测序证实与星形诺卡菌(*N. asteroides*)的模式菌株(ATCC19247)基因序列完全一致。

二、属的描述

表 30-1 中列出了下列各属的特异性显微和菌落形态学基本信息,部分属的其他相关信息见下面正文。关于需氧放线菌各属的化学分类学特征和耐溶菌酶试验的内容,参见本手册先前版本[3]。在随后的列表中,各属中列举的菌种来自 LPSN。

表 30-1　需氧放线菌各属形态特征[a]

属名（参考文献）	气生菌丝	改良抗酸染色	显微形态	图示	菌落形态[b]	图示
马杜拉放线菌属[250]	V	Neg	细长，短分枝丝状体	图 30-3a	粉状气生菌丝，呈蓝色、棕色、奶油色、灰色、绿色、粉色、白色、紫色或黄色；无气生菌丝时，菌落皱缩，外观呈皮革样或软骨样	图 30-2a 和 b
拟无枝酸菌属[4]	V	Neg	最好用玻片培养鉴别		白色、米黄色、黄色、橄榄色或棕色，可能有可溶性棕色色素	图 30-2f
棒杆菌属[c][251]	Neg	Neg	直或略弯曲杆菌，单个或成对排列，常呈 V 形或几个细胞平行成栅栏状；菌体可呈球杆菌状、珠状或棒状		因菌种而异	
嗜皮菌属[5,6]	Pos[d]	Neg	具分枝，菌丝有隔膜，直径 0.6～1.0 μm，菌丝体由单行或多达 8 行平行的呈纵向排列的球形细胞组成（见正文）	图 30-3d	延长培养时间后菌落从灰白色变为黄色或橙色；外观粗糙、拥挤，不透明，颗粒状，有 β-溶血现象，菌落可黏附在琼脂上	
链孢子菌属[7]	Pos	NF[e]	具分枝		皮革样菌落，黄色气生菌丝	
迪茨菌属[8]	Neg	Neg[f]	球杆状至杆状，常呈“V”形		光滑，黄色，圆形，隆起或凸起，有光泽，橙色到珊瑚红色，边缘完整	
戈登菌属[9]	Neg[g]	W	短棒状和球形，某些菌株具有分裂的分枝菌丝	图 30-3c	从光滑到微皱，不透明，米黄色到桃红色，奶油色，浅灰色，橙色，红白色，黄色或深粉色	图 30-2i
克氏菌属[11]	稀疏	NF[e]	具分枝，直杆或弯曲杆状		扁平，不规则，菌落边缘呈波浪形，表面暗淡，具放射状皱褶，呈象牙白色	
劳森菌属[12]		Pos	早期生长呈革兰阳性，小而不规则球菌，伴有短杆状和突出深染的大圆形细胞		针尖状，蜡状	
分枝杆菌属[c][252]	V	Pos	直或略弯曲杆状，革兰染色可呈现细长的串珠样杆状体或阴性		因菌种而异	
诺卡菌属[253]	Pos[h]	W	细长，丝状，具分枝，杆状，直径为 0.5～1.0 μm，通常呈串珠样（见正文）	图 30-3e～g、k 和 l	表面白垩样、无光泽或天鹅绒样、粉末状（常见），不规则，皱褶，堆积卷曲，或光滑；从反面观察，可呈棕色、棕褐色、粉色、橙色、红色、紫色、灰色、黄色、桃红色或白色；光滑或颗粒状；可产生可溶性棕色或黄色色素（见正文）	图 30-2d、e、g 和 l
拟诺卡菌属[16]	Pos	Neg	最好用玻片培养鉴别（见正文）		气生菌丝稀疏到丰富，呈蓝色、白色、奶油色、黄色、灰色或绿色；在气生菌丝上生成的孢子呈锯齿形排列；菌落粗糙地皱缩或折叠；可能有黄绿色或棕色可溶性色素	
假诺卡菌属[18]	V	Neg	最好用玻片培养鉴别		白色气生菌丝，黄色菌落	
红球菌属[22]	Neg[i]	W	球状至杆状（见正文）	图 30-3i 和 j	粗糙、光滑或黏液状；浅黄色、奶油色、黄色、橙色或红色；可出现无色变种；随培养时间延长，颜色可逐渐加深，表面更粗糙	图 30-2h
糖单胞菌属[27]	Pos	Neg	最好用玻片培养鉴别		皮革样，气生菌丝最初呈白色，逐渐变成灰绿色、深绿色或略带蓝色；产黄色、绿色或棕色可溶性色素	

（续 表）

属名（参考文献）	气生菌丝	改良抗酸染色	显微形态	图示	菌落形态[b]	图示
糖多胞菌属[28]	Pos	Neg	最好用玻片培养鉴别		薄的、隆起或凸起无色菌落，略带皱褶，黏液或凝胶状，具有稀疏的气生菌丝；可有黄色可溶性色素	
慢反应脂肪酸菌属[29]	Neg	强 Pos	杆状，偶呈 V 形，无分枝，大小因菌种而异	图 30-3m 和 n	外观光滑、半球形拱起到皱缩、粗糙，因菌种而异；无色素菌落；可产生可溶性色素	图 30-2m
链霉菌属[254]	Pos	Neg	丝状具分枝杆菌，直径为 0.5～2.0 μm，菌丝体可碎裂成短杆状，革兰染色阳性，比诺卡菌属更牢固，可呈串珠样		菌落不连续，呈苔藓样、皮革样或奶油状；色素多种多样；气生菌丝可呈絮状、粒状、粉末状或天鹅绒状；可产生有色可溶性色素	图 30-2c
高温放线菌属[32]	V	NF	随培养时间延长，革兰染色可变成阴性		生长缓慢，白色、黄色或无色菌落；气生菌丝可能很稀疏	
冢村菌属[33]	Neg	W	直或略弯曲长杆菌，单个、成对或成簇生长，可见极短的杆状体，无明显分支	图 30-3j	白色/奶油色至橙色，菌落小而向上凸起；表面干燥	图 30-2j 和 k
威廉姆斯菌属[34]	Neg	Neg	短杆状或球杆状（见正文）	图 30-3o	光滑，黄色、橙色至橙红色菌落	图 30-2n 和 o

注：[a] V. 可变；Neg. 阴性；Pos. 阳性；NF. 无试验结果；W. 弱阳性。[b] 菌落形态描述来源于各种参考文献，作者使用的培养基各不相同，详细信息请参阅文献。[c] 出于完整性考虑，将棒杆菌属和分枝杆菌属均当作需氧放线菌。[d] CO_2 含量增加条件下可产生气生菌丝。[e] 该菌无抗酸性，其改良抗酸染色反应未知。[f] 最初的描述是阳性。[g] *Godonaamarae* 菌可产稀疏气生菌丝。[h] 有时无气生菌丝产生。[i] 偶尔可见未成熟的气生菌丝

（一）马杜拉放线菌属（*Actinomadura*）

马杜拉放线菌属（*Actinomadura*）包含约 60 个获权威组织（国际原核生物分类委员会）认可和批准的种或亚种，其显微和菌落形态学与链霉菌属（*Streptomyces*）非常相似（图 30-2a、b 和图 30-3a），不同种之间菌落颜色差别很大。其细胞壁含有马杜拉糖（madurose），这是一种仅和嗜皮菌属（*Dermatophilus*）微生物共有的特征。

（二）拟无枝酸菌属（*Amycolatopsis*）

拟无枝酸菌属（*Amycolatopsis*）由 Lechevalier 等提出，用于一群诺卡菌属样（*Nocardia*-like）微生物的分类，其特点为革兰染色阳性，改良抗酸染色阴性，但不含分枝菌酸[4]（图 30-2f 和图 30-3b）。目前，拟无枝酸菌属中有约 70 个获权威组织认可和批准的种或亚种。

（三）嗜皮菌属（*Dermatophilus*）

嗜皮菌属（*Dermatophilus*）目前包含单个菌种刚果嗜皮菌（*Dermatophilus congolensis*），它与本章讨论的其他大多数微生物可能没有很近的亲缘关系。嗜皮菌属微生物为兼性厌氧菌，在 CO_2 含量增加的空气中培养，菌落可产生气生菌丝（aerial mycelia）[5]，其显微形态与众不同且令人印象深刻：呈分枝状，有横向和纵向隔膜（图 30-3d），常形成多达 8 行平行排列的球形细胞链[6]。在良好的生长环境条件下，球形细胞可发育成游动孢子。

（四）链孢子菌属（*Desmospora*）

链孢子菌属（*Desmospora*）目前包括 2 个种，其中只有 1 个种与人类疾病有关，即活力链孢子菌（*Desmospora activa*）。这个属的成员与高温放线菌属（*Thermoactinomyces*）中的菌种相关。活力链孢子菌呈丝状，耐热，从一个疑似结核患者的痰中分离得到，但不清楚是否为导致患者肺部疾病的病原菌[7]。

（五）迪茨菌属（*Dietzia*）

海洋迪茨菌（*Dietzia maris*）曾属于红球菌属，因化学分类和 16S rRNA 基因序列与其他红球菌不同而从红球菌属中移出[8]。迪茨菌分离株极罕见有分枝，分枝可呈球状或杆状。迪茨菌属含有大约 13 个种，然而，即使采用基因测序方法，

区分菌种也可能极其困难。

(六)戈登菌属(*Gordonia*)

戈登菌属(*Gordonia*)细菌革兰染色后显微镜下呈棒状杆菌样,痰标本中很容易把它误认为口腔正常菌群(图 30-3c)。"*Gordona*"菌属(现为 *Gordonia*)最早由 Tsukamura 描述,1988 年 Stackebrandt 等重新引入戈登菌属,属内各种微生物均含有 46~66 个碳链长度的分枝菌酸和主要由 9 个异戊二烯单元构成的甲基萘醌。戈登菌和红球菌也可通过 16S rRNA 基因序列区分[9]。该属约有 38 个获权威组织认可和批准的种(图 30-2i 和图 30-3c)。

(七)克罗彭斯特菌属(*Kroppenstedtia*)

克罗彭斯特菌属(*Kroppenstedtia*)最初根据在一个生产企业环境筛查时从塑料制品表面分离到的一株菌株进行定义,随后从各种临床样本中均分离到象牙色克罗彭斯特菌(*Kroppenstedtia eburnea*)。该属有 2 个种,其特征描述已获权威组织认可。不过,近期的一篇文章报道了另外 2 个种,肺炎克罗彭斯特菌(*Kroppenstedtia pulmonis*)和血克罗彭斯特菌(*Kroppenstedtia sanguinis*),从肺活检、血液和脑脊液标本中分离[10]。除细胞壁肽聚糖中含有 LL-二氨基庚二酸(LL-diaminopimelic acid)外,克罗彭斯特菌种具有典型的高温放线菌科(Thermoactinomycetaceae)成员菌的化学分类和分子特征(该科其他菌的二氨基庚二酸为内消旋结构[11])。

(八)劳森菌属(*Lawsonella*)

劳森菌属(*Lawsonella*)是依据从人体脓肿中分离出的具有独特生长特征的病原体来定义的。该属包括一个种,克利夫兰劳森菌(*Lawsonella clevelandensis*),是一种缓慢生长(5~7 天)的微生物,且要求氧分压小于 1%。该菌种的成员早期呈革兰阳性,并随着菌落生长变成革兰变异体。系统进化分析表明 *L. clevelandensis* 与帝汶迪茨菌(*Dietzia timorensis*)最为相近。该微生物体的生态位尚不清楚[12]。

(九)诺卡菌属(*Nocardia*)

最常分离到的人类病原菌中的需氧放线菌属于诺卡菌属,该属包含约 100 个获权威组织认可和批准的种。直接革兰染色涂片时,菌体通常显示为非常长且纤细的、分支明显的小串珠样革兰阳性杆菌(图 30-3e、k)。与单个细胞组成链球菌样链不同的是,诺卡菌小串珠间通常不会相互紧密相邻(图 30-3h、o)。特别需要注意的是,当用培养物制备涂片时,菌体可显示链球菌样链或小分支样丝状体,可能是由于脆弱的诺卡菌菌丝体在涂片过程中破裂所致[13-14](图 30-3e、f、g、k 和 l)。

诺卡菌菌落形态种与种之间存在差异,即使同一种内株与株之间也常有所不同(图 30-2d、e、g 和 l)。菌落在半透明培养基(如萨布罗琼脂,Sabouraud agar)上生长时,最好从培养基背面观察菌落颜色,因为表面菌落颜色可能被该属细菌产生的典型粉状气生菌丝所遮挡。

有必要简短说明"星形诺卡菌(*Nocardia asteroides*)"命名的由来,以澄清一个令人困惑的、未被广泛接受的分类学问题。1888 年,Edmond Nocard 获得一株据认为是牛皮疽病(bovine farcy)病原体的菌株,1889 年 Trevisan 将其命名为"皮疽诺卡菌(*Nocardia farcinica*)",随即它成为该属及种的模式菌株。Gordon 和 Mihm[15]后来发现,采用他们的一组表型试验不能将皮疽诺卡菌从已命名为"星形诺卡菌"的菌株中区分出来。鉴于 Nocard 所获菌株的某些不确定性以及假定皮疽诺卡菌和星形诺卡菌为同种微生物,有人递交申诉书要求司法委员会将诺卡菌属的模式种变更为星形诺卡菌,同时选择 ATCC 19247 作为该种的模式菌株;虽然申诉已经接受,但那株皮疽诺卡菌菌株仍然作为那个特殊种的模式菌株保留下来,因为不是所有人都确信这 2 个种真正完全相同。

(十)拟诺卡菌属(*Nocardiopsis*)

拟诺卡菌属(*Nocardiopsis*)最早由 Meyer 描述,以划分一种当时虽称为达松维尔马杜拉放线菌(*Actinomadura dassonvillei*),但其化学分类及某些菌落形态特征与马杜拉放线菌属其他微生物并不相同的微生物。拟诺卡菌属微生物细胞壁不含马杜拉糖,基内菌丝体碎裂成球形,气生菌丝碎裂成大小不同的孢子[16]。目前,该属约有 46 个已命名的种或亚种。拟诺卡菌属的种主要是由于它们所产生的生物活性化合物在生物技术中的应用而闻名[17]。

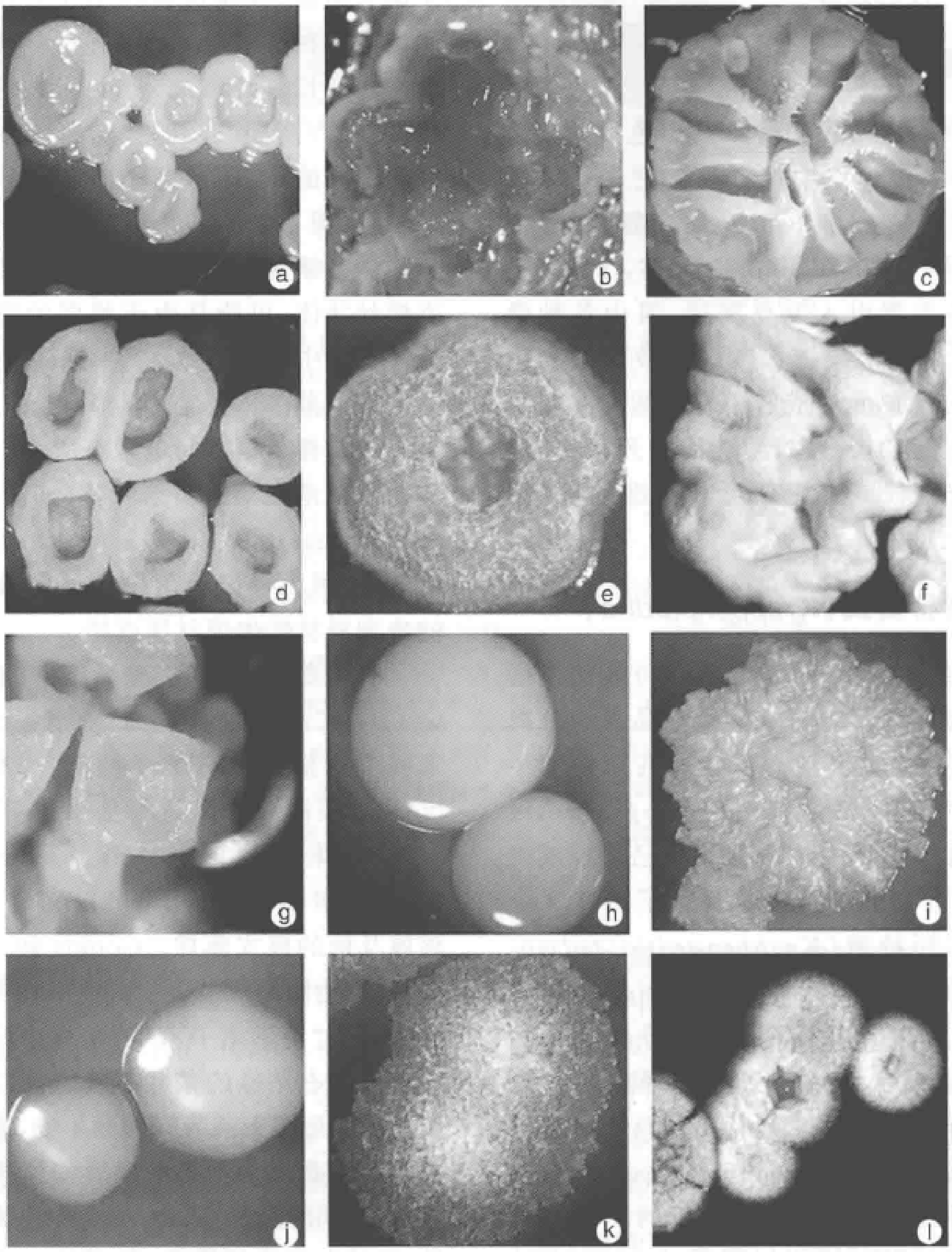


图 30-2 各种需氧放线菌模式菌株在萨布罗葡萄糖琼脂(Emmons 改良)上的菌落形态,另有注明除外。菌落外观为图示菌种的典型外观,同种微生物菌落外观可能存在变异,但变异程度未知

注:a. 拉丁马杜拉放线菌(*Actinomadura latina*)第 21 天(光滑脐状菌落,无气生菌丝);b. 白乐杰马杜拉放线菌(*Actinomadura pelletieri*)第 10 天(黏稠但表面光滑菌落,无气生菌丝);c. 灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)第 10 天(多皱褶菌落,有少许气生菌丝);d. 巴西诺卡菌(*Nocardia brasiliensis*)第 10 天(脐状菌落,有稀疏气生菌丝,仅在显微镜下可见);e. 肉色诺卡菌(*Nocardia carnea*)第 25 天(有气生菌丝);f. 东方拟无枝酸菌(*Amycolatopsis orientalis*)第 21 天(有气生菌丝);g. 豚鼠耳炎诺卡菌(*Nocardia otitidiscaviarum*)第 7 天(多皱褶菌落,有稀疏气生菌丝,仅在显微镜下仔细观察时可见);h. 马红球菌(*Rhodococcus equi*)第 10 天(光滑菌落,无气生菌丝);i. 支气管戈登菌(*Gordonia bronchialis*)第 10 天(不规则但表面平滑菌落,无气生菌丝);j. 肺冢村菌(*Tsukamurella pulmonis*)第 10 天(光滑菌落,无气生菌丝);k. 斯氏冢村菌(*Tsukamurella strandjordii*)第 10 天(粗糙菌落,无气生菌丝);l. 盖尔森基兴诺卡菌(*Nocardia cyriacigeorgica*)第 10 天(稠密粉状气生菌丝覆盖菌落大部分或整个表面),见彩插

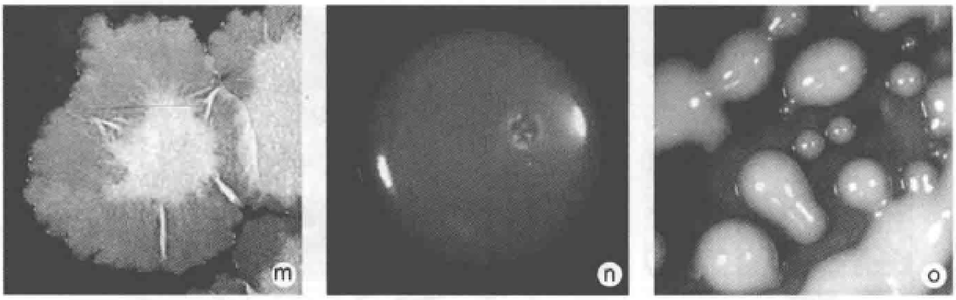


图 30-2(续)

注：m. 褶皱慢反应脂肪酸菌(*Segniliparus rugosus*)在 Middlebrook 琼脂生长第 15 天(粗糙菌落，无气生菌丝)；n. 挑剔威廉姆斯菌(*Williamsia deligens*)第 15 天(光滑菌落，无气生菌丝)；o. 壁威廉姆斯菌(Williamsia muralis)第 15 天(黏液型菌落)

(十一)假诺卡菌属(*Pseudonocardia*)

假诺卡菌属(*Pseudonocardia*)细菌显微形态以出芽延伸而形成节段样气生菌丝为特征。气生菌丝和基生菌丝常呈锯齿形[18]。一项基于 16S rRNA 基因序列的研究建议将无枝酸菌属(*Amycolata*)和假诺卡菌属合并为一个新校订的属，即假诺卡菌属[19]。目前，该属文献报道的种约有 54 个。

(十二)红球菌属(*Rhodococcus*)

红球菌显微镜下形态呈球状至杆状，具体形态取决于菌种或标本类型，以及微生物所处生长阶段。红球菌属微生物可呈杆状到球状的生长周期。在液体培养基中培养最易观察到杆状，在此条件下，还可发现个别细胞出现分支[20]。但通常情况下，细菌呈现为牢固染色的革兰阳性球杆菌或串珠样外观(图 30-3h)。疑为红球菌属菌株时，必须进行改良抗酸染色，且判读结果时须特别仔细，因为只有一小部分细胞可保留染色(图 30-3i)，但当用含 5%羊血的胰酪胨大豆琼脂或巧克力琼脂培养菌株行改良抗酸染色时，结果可能呈阴性[21]。由于在生长的最初几天常难以观察到明显的色素沉积，根据革兰染色形态(图 30-3h)很容易将红球菌当作"类白喉杆菌"处理。红球菌 37℃培养 24 h，菌落直径可能仅约 1 mm；气生菌丝通常肉眼不可见，但偶尔可通过显微镜观察到[22]。红球菌属大约有 49 个已命名的种。最近有人提议将马红球菌(*Rhodococcus equi*)移至一个新的属，即 *Prescottella*(起初认为是非正规的 *Prescottia* 属)，目前该属名虽已在非国际原核生物分类委员会官方期刊中有效发表使用，但 LPSN 仍未正式收载描述[23-24]。Kämpfer 等报道霍氏棒杆菌(*Corynebacterium hoagii*)(1912 年首次报道)模式菌株与马红球菌模式菌株具有相同的基因型和表型特征，因菌种名"*hoagii*"作为最古老的称谓具有优先权，其建议将马红球菌重新分类为霍氏红球菌(*Rhodococcus hoagii*)[25]。本文采用马红球菌这个名字。

橙色红球菌(*Rhodococcus aurantiacus*)ATCC 25938(该菌种最初的模式菌株)有着错综复杂的分类史，已被归类到微代谢冢村菌(*Tsukamurella paurometabola*)[26]。

(十三)糖单胞菌属(*Saccharomonospora*)

已描述的糖单胞菌属菌种中，约有 9 个种均以单个孢子紧贴在气生菌丝上为特征。这类微生物通常存在于土壤、湖泊沉积物、泥炭、堆肥和粪肥中，中度嗜热，最佳生长温度为 35～50℃[27]。该菌属大约有 12 个已命名的种。

(十四)糖多胞菌属(*Saccharopolyspora*)

基于生化特征，糖多胞菌属菌种最初被认为与诺卡菌和链霉菌有关，但它们在系统发育上有明显区别。糖多胞菌最早从甘蔗中分离得到，显微形态类似于拟诺卡菌属菌种。其命名是由于气生菌丝分节段而形成的鞘内封闭孢子(sheath-enclosed spores)珠状链的存在。糖多胞菌可在 25～50℃生长，最佳生长温度为 37～40℃[28]。本属已描述的种和亚种约有 29 个。

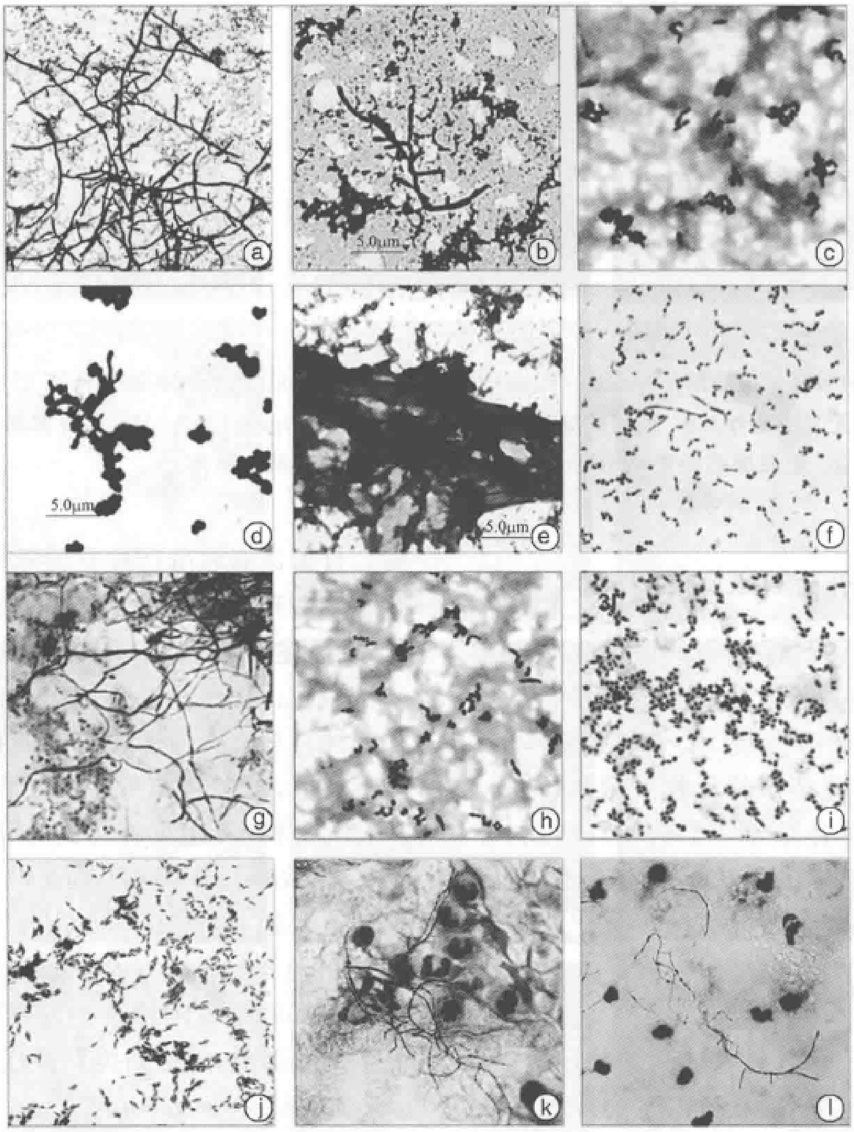


图 30-3 各种需氧放线菌的显微形态(所有显微照片放大 1000 倍)

注:a. 拉丁马杜拉放线菌(*Actinomadura latina*)[Tween-albumin broth(TAB)培养 4 天后,革兰染色显示为长、有分枝、染色相对牢固的杆状体];b. 自养无枝酸菌(*Amycolata autotrophica*)(TAB 培养 4 天后革兰染色,显示为具少许分枝的长串珠样杆状体);c. 支气管戈登菌(*Gordonia bronchialis*)(TAB 培养 4 天后革兰染色,显示为无明显分枝的棒形杆状体);d. 刚果嗜皮菌(*Dermatophilus congolensis*)[CO_2 环境下萨布罗葡萄糖琼脂培养 14 天后,革兰染色可见各种大小细胞聚集体(注意近顶部横纵分割细胞的链)];e. 脓肿诺卡菌(*Nocardia abscessus*)[TAB 培养 10 天后革兰染色,显示为长的、串珠样、有分枝的杆状体(小珠通常不相互紧密邻接)];f. 皮肤诺卡菌(*Nocardia farcinica*)[马血琼脂培养 2~3 天后改良抗酸染色,显示为许多球菌样形态(大多数为改良抗酸染色阳性)];g. 老兵诺卡菌(*N. veterana*)(TAB 培养 25 天后改良抗酸染色,显示为染色阳性的一些长的、分枝状形态);h. 马红球菌(TAB 培养 4 天后革兰染色,显示为无明显分枝球杆状体和短棒形杆状体);i. 马红球菌[活性炭酵母抽提物(CYE)琼脂培养 10 天后改良抗酸染色,仅有小部分细胞染色阳性];j. 肺冢村菌(*Tsukamurella pulmonis*)(Lowenstein-Jensen 培养基培养 4 天后改良抗酸染色,显示细杆状体,大多染色阳性);k. 分离出一种诺卡菌的痰直接革兰染色[注意细长、有分枝的、串珠样杆状体组成的蕾丝网状物(Daniel P. Fedorko 授权)];l. 与图片 K 相同的标本直接改良抗酸染色[小珠略带紫色,但小珠之间区域染色阳性(Daniel P. Fedorko 授权)],见彩插

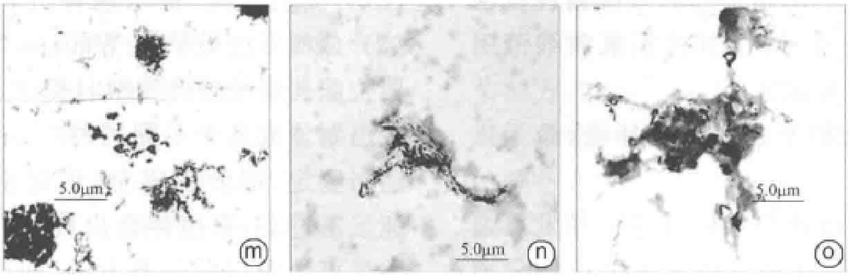


图 30-3(续)

注：m. 光滑慢反应脂肪酸菌(*Segniliparus rotundus*)(Middlebrook 培养 12 天后 Kinyoun 染色)；n. 褶皱慢反应脂肪酸菌(*Segniliparus rugosus*)(TAB 培养 7 天后革兰染色)；o. 挑剔威廉姆斯菌(TAB 培养 5 天后革兰染色)

(十五)慢反应脂肪酸菌属(*Segniliparus*)

慢反应脂肪酸菌属是新近描述的一个属，4 株认为是属于分枝杆菌属的临床分离株，由于存在独特的高效液相色谱分枝菌酸模式，对其进行深入调查后形成该属特性。通过 16S rRNA 基因测序，该属与红球菌属成员菌关系最为亲近，细胞壁化学将它与红球菌属及其他相关属一起划归棒杆菌亚目[29]。慢反应脂肪酸菌是唯一呈强抗酸性的需氧放线菌(分枝杆菌除外)(图 30-2m，图 30-3m 和 n)。属内有 2 个种，其特征描述已获权威组织认可。

(十六)链霉菌属(*Streptomyces*)

链霉菌属为一个巨大组群，包括约 800 个已命名的种或亚种，其属、种水平分类仍存在问题[30-31]。由于能合成具有商业价值的产物，链霉菌属内许多菌种已经申请了专利[30](图 30-2c)。

(十七)高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)

高温放线菌属中约有 4 个种，以产生丰富的耐高温且易于空气传播的内生孢子为特征。该属细菌常发现于土壤、发霉腐烂的植物材料和堆肥中，最佳生长温度因菌种而异，但大多介于 35～58℃[32]。从 16S rRNA 基因序列和 G+C 含量分析，相较于需氧放线菌其他属，高温放线菌属内成员菌与芽胞杆菌属(*Bacillus*)的亲缘关系更为接近，被划归于需氧放线菌是由于它们具有相似的形态学特征。

(十八)冢村菌属(*Tsukamurella*)

设立冢村菌属是为了容纳一群具有特殊细胞壁化学结构的微生物，并以此能将它们与其他需氧放线菌区分开来[33]。微代谢冢村菌是本属的模式菌种，以前被称为微代谢棒杆菌(*Corynebacterium paurometabolum*)。属内约有 14 个已命名的种(图 30-2j 和 k，图 30-3j)。

(十九)威廉姆斯菌属(*Williamsia*)

威廉姆斯菌属是新设立的一个属，包括那些与诺卡菌科各属微生物相似但具有异常细胞形态的环境微生物。电镜下，威廉姆斯菌细胞可显现分布于整个细胞表面的毛状结构，负染时不可见，表明这种结构由纤维包膜物质构成，并非真正的菌毛[34]。该属大约有 10 个种(图 30-2n 和 o，图 30-3o)。

三、流行病学和传播

虽然需氧放线菌广泛分布于环境中，包括土壤和水生栖息地，但特定菌种的具体地理分布仍不清楚，其主要的生态作用可能是分解植物体，同时也是家畜的潜在病原体[31]。

大多数由需氧放线菌引起的感染源于环境，是导致足菌肿、皮肤感染和脓肿、肺脓肿和偶发播散性疾病的病原体。放线菌性足菌肿是一种由需氧放线菌引起的皮肤病，尤其是马杜拉放线菌属、链霉菌属和诺卡菌属，常见于位于北回归线附近

的“足菌肿地带”。诺卡菌属引起的放线菌性足菌肿常发生在湿度较高的地区，其他需氧放线菌引起的足菌肿常见于干燥地区[35]。

大多数院内感染似乎也归因于环境，尚无人传人的病例记载。

2起支气管戈登菌致胸骨伤口感染暴发可追溯到护理人员，从其手部和身体其他部位均分离到该病原微生物，其中1例还从护士喂养的2条犬身上分离出该病原菌[36-37]。Exmelin等通过随机扩增多态性DNA分析报道了一起皮疽诺卡菌(*N. farcinica*)在心脏移植患者中引起的暴发感染，但暴发的来源不确定[38]。据报道，在一家西弗吉尼亚肿瘤诊所暴发了一起冢村菌属引起的15名留置中心静脉导管患者血流感染，唯一有意义的危险因素是共用一袋预先备好的盐水进行冲洗[39]。

也曾有一起由微代谢冢村菌引起的假性感染(pseudoinfection)暴发的报道，共涉及10个不同患者标本，且均归因于一个共同的来源——实验室某处污染源[40]。还有其他由微代谢冢村菌和耐酪氨酸冢村菌引起的假性暴发报道(由于包装不当及随后被污染的样品处理设备)[40-41]。

四、临床意义

随着人类认知的需氧放线菌菌种数量的迅速增加，对其临床意义的评估变得越来越困难。在某些情况下，仅依据单一菌株的描述来认识一个新菌种，研究者的关注重点一般集中于分子特征，却没有或很少提供用以证明分离菌株确系该患者病因的信息。虽然基因测序现在常常用来鉴定与人类疾病起因有关的需氧放线菌，但许多以前分离出特殊病原体的报道中，由于无法提供所用分子技术及结果解释法的细节，鉴定结果的准确性存疑。此外，按目前公认的物种划分标准，较早文献报道中的许多鉴定结果应认为是不正确的，星形诺卡菌可能是一个最好的例子，按目前公认的分类方法，只有极少文献资料表明其为人类病原体。

不幸的是，所有这些因素均会干扰临床有用信息和给定菌种之间准确关系的判断，尤其是不常见的菌种和属。为此，有研究者提出分群解决方法，即根据微生物某种特性，如抗菌药物敏感性，将种组合成“群”，这种分群方法呈现增长趋势。分群方法最早由Wallace等在研究星形诺卡菌抗菌药物敏感谱类型时提出，不过，那些菌株现在已划分成几个不同的种[42]。当前，对“种”的描述与鉴定，即使不完全，也是主要依据其分子特征。不过，未来也许会出现一个独立的但与临床关系更为密切的分类方法，即以微生物基本分子结构中可能有的基础特征为基础，例如，致病性、抗菌药物敏感性及致病类型。

表30-2列出了已确定为人类病原体并通过基因序列分析鉴定的非诺卡菌属的需氧放线菌菌种。该表显示了分离的生物体的样本来源，并进一步说明了该分离生物体是否具有临床意义。表30-3列出了已经报道的从人类分离出的诺卡菌属。每当实验室分离到一株基因序列显示其属于极少分离到的需氧放线菌菌种时，应当仔细评估微生物分离环境以评价其潜在临床意义(表30-2和表30-3)。也可查阅当前文献以确定关于该菌种的所有已知信息，包括已知的致病性和抗菌药物敏感性。LPSN和PubMed(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)是很好的文献查阅起点，命名和分类目前应参照LPSN。

对于下文列出的属，每一个都尽其所能地包含通过基因测序鉴定的结果的唯一信息。表30-2和表30-3分别列出了有临床意义的需氧放线菌(非诺卡菌属)和诺卡菌属引起的感染类型的概述。

(一)马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)

识别马杜拉放线菌属微生物的一个有用线索是菌株分离部位的病变特点。马杜拉放线菌最常引起足菌肿(mycetoma)，一种通常发生在足部(马杜拉足，Madura foot)和附近组织结构的慢性、侵袭性、缓慢进展性感染，几乎都是由微生物外伤性植入引起。典型足菌肿存在引流窦道，病变部位排泌物中肉眼可见颗粒状物(细菌聚集体或小菌落)。马杜拉放线菌引起的感染常见于居民习惯于赤足行走的热带地区。“足菌肿”一词仅用于描述感染的临床特点，而非病原体。放线菌性足菌肿(actinomycotic mycetomas)由需氧放线菌导致，真菌性足菌肿(eumycotic mycetomas)才真正是由真菌引起的感染。马杜拉放线菌属微生物极少引起其他类型的感染，已有舌、脊柱和腹壁感染

的报道[43-44](表 30-2)。马杜拉马杜拉放线菌(*Actinomadura madurae*)和白乐杰马杜拉放线菌(*Actinomadura pelletieri*)是马杜拉放线菌中最常报道的两种病原菌;最近,从一位呼吸道感染患者中分离出一个新的菌种——痰马杜拉放线菌(*Actinomadura sputi*)[45]。在很多提及引起足菌肿菌种报道中,菌种的鉴定仅仅依据"颗粒"的组织学外观、少量表型试验或没有指定任何鉴定细节的方式,而实际上,如同所有需氧放线菌一样,分子生物学方法是将本属细菌明确鉴定至种水平的唯一方法。

表 30-2 根据基因序列定义的从人类标本中分离的目前有效描述的需氧放线菌

属	种	16S rRNA 基因序列	常见分离菌	来源				
				表皮/软组织	肺	血液	其他	未知
拟无枝酸菌属	千叶马杜拉放线菌(*Actinomadura chibensis*)	AB264086[a]						+[b]
	乳脂马杜拉放线菌(*Actinomadura cremea*)	NR_112823[c]			+[b]			
	拉丁马杜拉放线菌(*Actinomadura latina*)	AY035998[a]						+[b]
	马杜拉马杜拉放线菌(*Actinomadura madurae*)	X97889[a]	Yes	+	+			
	产亚硝酸盐马杜拉放线菌(*Actinomadura nitritigenes*)	AY035999[a]			+[b]			
	白乐杰马杜拉放线菌(*Actinomadura pelletieri*)	AJ293710[a]	Yes	+		+		
	痰马杜拉放线菌(*Actinomadura sputi*)	NR_116929[a,c]			+[b]			
拟无枝酸菌属	解甲苯酸盐拟无枝酸菌(*Amycolatopsis benzoatilytica*)	AY957506[a]		+[b]				
	东方拟无枝酸菌(*Amycolatopsis orientalis*)	AJ400711[a,d]						+
	腭咽拟无枝酸菌(*Amycolatopsis palatopharyngis*)	AF479268[a]						+
嗜皮菌属	刚果嗜皮菌	AJ243918[a]	Yes					
链孢子菌属	活力链孢子菌	NR_042692[a,c]			+[b]			
迪茨菌属	橙色迪茨菌(*Dietzia aurantiaca*)	FR821260[a]					CSF[b]	
	肉桂色(*Dietzia cinnamea*)	AJ920289[a]		+				
	海洋迪茨菌	X79290[a]				+	髋关节	
	乳头状瘤病迪茨菌(*Dietzia papillomatosis*)	AY643401[a]		+[b]				
戈登菌属	友好戈登菌(*Gordonia amicalis*)	AF101418[a]		+				
	新井戈登菌(*Gordonia araii*)	AB162800[a]			+[b]		关节液	
	支气管戈登菌(*Gordonia bronchialis*)	NR_074529[a,c]	Yes	+	+	+[b]	CSF,骨	
	扩散戈登菌(*Gordonia effusa*)	AB162799[a]			+			
	香港戈登菌(*Gordonia hongkongensis*)	LC072670[a]				+[b]		
	耳炎戈登菌(*Gordonia otitidis*)	AB122026[a]				+[f]		
	食异戊二烯戈登菌(*Gordonia polyisoprenivorans*)	Y18310[a]			+	+[f]		
	暗红色戈登菌(*Gordonia rubripertincta*)	X80632[a]						
	痰戈登菌(*Gordonias puti*)	NR_119122[a,c]				+[e]		
	土地戈登菌(*Gordonia terrae*)	X79286[a]	Yes			+[e,f]	肾周脓肿	
克氏菌属	象牙色克氏菌(*Kroppenstedtia eburnea*)	FN665656[a]		+[b]		+	CSF,腹膜液[b]	
	肺克氏菌(*Kroppenstedtia pulmonis*)	KC875234[a]			+			
	血克氏菌(*Kroppenstedtia sanguinis*)	AJ251778[a,g]				+	CSF	

（续 表）

属	种	16S rRNA 基因序列	常见分离菌	来源 表皮/软组织	肺	血液	其他	未知
拟诺卡菌属	达氏拟诺卡菌（*Nocardiopsis dassonvillei*）	X97886[a]	Yes	+		+	鼻前庭炎	
红球菌属	类棒杆菌红球菌（*Rhodococcus corynebacterioides*）	AF430066[a]				+		
	马红球菌	X80614[a]	Yes	+	+	+	肝脓肿，腹水[e]	
	束红球菌（*Rhodococcus fascians*）	X79186[a]					肝损伤	
慢反应脂肪酸菌属	光滑慢反应脂肪酸菌（*Segniliparus rotundus*）	AY608918[a]			+			
	褶皱慢反应脂肪酸菌（*Segniliparus rugosus*）	AY608920[a]			+			
链霉菌属	白色链霉菌（*Streptomyces albus*）	AJ621602[a]		+				
	比基尼链霉菌（*Streptomyces bikiniensis*）	X79851[a]				+		
	可可链霉菌可可亚种（*Streptomyces cacaoi* ssp. *cacaoi*）	AB184115[a]		+				
	绿色链霉菌（*Streptomyces viridis*）	FR692117[a]					腹水	
	索马里链霉菌（*Streptomyces somaliensis*）	AJ007403[a]	Yes	+				
	嗜热一氧化碳链霉菌（*Streptomyces thermocarboxydus*）	U94490[a]					角膜	
冢村菌属	香港冢村菌（*Tsukamurella hongkongensis*）	KP888572[a]				+	角膜	
	仁川冢村菌（*Tsukamurella inchonensis*）	AF283281[a]				+		
	微代谢冢村菌（*Tsukamurella paurometabola*）	NR_074458[a,c]	Yes			+[f]		
	肺冢村菌（*Tsukamurella pulmonis*）	X92981[a]			+	+[f]	角膜	
	中华冢村菌（*Tsukamurella sinensis*）	KP888571[a]					结膜	
	泡沫冢村菌（*Tsukamurella spumae*）	Z37150[a]					角膜，耳	
	斯氏冢村菌（*Tsukamurella strandjordi*）	AF283283[a]				+[f]		
	溶酪氨酸冢村菌（*Tsukamurella tyrosinosolvens*）	AY238514[a]	Yes			+[f]	角膜，脑脓肿	
威廉姆斯菌属	挑剔威廉姆斯菌（*Williamsia deligens*）	AJ920290[a]				+[b]		
	壁威廉姆斯菌（*Williamsia muralis*）	Y17384[a]			+		玻璃体液	
	食丝氨酸威廉姆斯菌（*Williamsia serinedens*）	AM283464[a]				+		

注：[a] 该菌种的模式菌株；[b] 临床意义未知；[c] RefSeq 的精选序列；[d] 东方拟无枝酸菌亚种；苍黄亚种的序列＝AJ577997；[e] 部分病例与腹膜透析相关；[f] 导管相关；[g] 当作血液高温放线菌（*Thermoactinomyces sanguinis*）提交；[h] CFS. 脑脊液

（二）拟无枝酸菌属（*Amycolatopsis*）

最近报告的唯一一例人类来源的拟无枝酸菌分离株来源于一位老年患者的腭咽黏膜，被命名为一个新的菌种腭咽拟无枝酸菌（*Amycolatopsis palatopharyngis*）。该报告没有提供有关该分离株致病性的任何资料[46]。

（三）嗜皮菌属

刚果嗜皮菌（*Dermatophilus congolensis*）在世界范围内引起各种动物皮炎，包括牛、马、山羊和绵羊，但极少报道为人类感染病原体[47]。据报道，该菌致人感染时可引发各种皮肤症状，包括瘙痒性皮疹、鳞屑和渗出性皮损、脓疱、窝状角质松解症及舌毛状白斑。在组织标本中可直接观察到该病原体的丝状和球形菌体。目前，刚果嗜皮菌感染尚无确切的最佳治疗方案，其感染可能呈自限性。从热带地区归来的旅游者，特别是先前存在皮损的部位在与动物接触后损害进一步加重的，应考虑刚果嗜皮菌感染[47]。

(四)迪茨菌属(*Dietzia*)

到目前为止,已报道的由迪茨菌属细菌导致的感染病例较少,且均由海洋迪茨菌引起,包括从血液和静脉内导管[48]、1例人工髋关节相关性感染[49]和1例主动脉夹层病例分离到的菌株。最近有文献报道了从临床标本中分离出其他迪茨菌属菌种,包括橙色迪茨菌(*Dietzia aurantiaca*)[51]、肉桂色迪茨菌(*Dietzia cinnamea*)[52]和乳头状瘤病迪茨菌(*Dietzia papillomatosis*)[53],在其中一些病例中,分离株的临床意义尚不清楚。这些新菌种的最新描述是使用蛋白质分析和基因测序来协助该属的分离菌株进行明确鉴定得到。传统的生化试验或商品化的革兰阳性杆菌鉴定卡不足以区分迪茨菌属细菌和马红球菌。一份报道还指出,即使采用2个不同分子靶标进行基因测序来区分某对迪茨菌属细菌[如海洋迪茨菌和木荷迪茨菌(*D. schimae*)]也是不可能的[54];目前尚不确定是否有可行的方法来区分这2个菌株。

(五)戈登菌属(*Gordonia*)

最近的报道表明戈登菌属的分离率越来越高;这些报道还列出了越来越多的与人类感染相关的菌种。不过,由于戈登菌可能会被认定为无关紧要的棒状革兰阳性杆菌,或者被错误鉴定为其他属细菌,如诺卡菌或红球菌,临床分离鉴定时可能会遗漏未知数量的戈登菌感染[55]。戈登菌属引起的感染类型包括原发性菌血症,呼吸道、皮肤和中枢神经系统感染(表30-2)。众多已报告的感染病例表明这些感染与导管、透析及植入医疗器械有关[56-58]。但心脏手术后发生的胸骨伤口聚集性感染极少见[37,59]。与其他需氧放线菌一样,免疫功能低下可能是许多戈登菌感染的促成因素[60]。

表 30-3 以基因序列为特征的具有临床意义的目前有效描述的诺卡菌属

种	模式菌株16S rRNA基因序列的GenBank编号	描述年份	常分离菌	来源			
				临床意义不明[a]	表皮/软组织	肺	播散性
脓肿诺卡菌(*N. abscessus*)	AF430018	2000	Yes		+[b]	+	+
非洲诺卡菌(*N. africana*)	AF430054	2001				+	
甜味诺卡菌(*N. amamiensis*)	AB275164	2007		+	+[b]	+	
耐阿米卡星诺卡菌(*N. amikacinitolerans*)	GU985442	2013			+[b]	+	
贫血诺卡菌(*N. anaemiae*)	GQ376192	2005		+			
青叶町诺卡菌(*N. aobensis*)	GQ376159	2005					
荒尾诺卡菌(*N. araoensis*)	GQ376160	2004		+	+	+	
关节炎诺卡菌(*N. arthritidis*)	GQ217494	2004		+	+	+	
亚利桑那诺卡菌(*N. arizonensis*)[c]	JN678715	2015		+		+	
亚洲诺卡菌(*N. asiatica*)	GQ217495	2004				+	
星形诺卡菌(*N. asteroides*)	DQ659898	1891		+			
北京诺卡菌(*N. beijingensis*)	GQ217493	2001			+[b]	+	+

（续 表）

种	模式菌株16S rRNA基因序列的GenBank编号	描述年份	常分离菌	来源			
				临床意义不明[a]	表皮/软组织	肺	播散性
布氏诺卡菌（*N. blacklockiae*）	GQ376162	2008		+		+	
布瓦龙诺卡菌（*N. boironii*）[c]	KU131666	2016			+		
巴西诺卡菌（*N. brasiliensis*）	AF430038	1909	Yes		+[b]		
短链诺卡菌（N. brevicatena）	AF430040	1961		+			
肉诺卡菌（*N. carnea*）	AF430035	1891		+		+	+
塞拉多诺卡菌（*N. cerradoensis*）	AF060790	2003		+		+	+
凹陷诺卡菌（*N. concava*）	EF177464[d]	2005				+	+
圣乔治诺卡菌（*N. cyriacigeorgica*）	GQ376180	2001	Yes			+	+
N. donostiensis[c]	KM233637	2016		+		+	
苛养诺卡菌（*N. elegans*）	GQ376166	2005				+	+
微白诺卡菌（*N. exalbida*）	GQ376167	2006		+	+[b]		
皮疽诺卡菌（*N. farcinica*）	AF430033	1889	Yes		+[b]	+	+
河沙诺卡菌（*N. harenae*）	DQ282122	2006			+	+	+
熊本诺卡菌（*N. higoensis*）	GQ376169	2004		+		+	+
未知诺卡菌（*N. ignorata*）	DQ659907[d]	2001		+	+		
千叶诺卡菌（*N. inohanensis*）	DQ659908	2004		+	+		
济南诺卡菌（*N. jinanensis*）	DQ462650	2009		+	+		
克氏诺卡菌（*N. kroppenstedtii*）	DQ157924	2014		+		+	+
克鲁切克诺卡菌（*N. kruczakiae*）	DQ659909	2004			+[b]	+	
墨西哥诺卡菌（*N. mexicana*）	GQ376178	2006			+	+	+
三上诺卡菌（*N. mikamii*）	EU484388	2010				+	+
新喀里多尼亚诺卡菌（*N. neocaledoniensis*）	GQ853080	2004		+	+		

（续　表）

种	模式菌株 16S rRNA 基因序列的 GenBank 编号	描述年份	常分离菌	来源			
				临床意义不明[a]	表皮/软组织	肺	播散性
新潟诺卡菌 (*N. niigatensis*)	GQ853079	2004			+		
尼纳诺卡菌 (*N. ninae*)	GQ853078	2007		+		+	
丹羽诺卡菌 (*N. niwae*)	FJ765056	2011			+		
新诺卡菌 (*N. nova*)	AF430028	1983	Yes			+	+
豚鼠耳炎诺卡菌 (*N. otitidiscaviarum*)	AF430067	1924			+[b]	+	+
寡食诺卡菌 (*N. paucivorans*)	GQ376188	2000					+
肺炎诺卡菌 (*N. pneumoniae*)	GQ853075	2004		+		+	
假巴西诺卡菌 (*N. pseudobrasiliensis*)	AF430042	1995	Yes			+	+
脓液诺卡菌 (*N. puris*)	GQ217500	2003		+	+[b]		
信浓诺卡菌 (*N. shinanonensis*)	LC103184	2016		+	+[b]		
赭黄色诺卡菌 (*N. sienata*)	AB516654	2004		+		+	
武田诺卡菌 (*N. takedensis*)	GQ376185	2005			+	+	
萜烯诺卡菌 (*N. terpenica*)	GQ376183	2007		+		+	
砖色诺卡菌 (*N. testaceae*)	AB192415	2004		+		+	
泰国诺卡菌 (*N. thailandica*)	AB126874	2005		+	+[b]	+	
德兰士瓦诺卡菌 (*N. transvalensis*)	AF430047	1927				+	+
蠕虫诺卡菌 (*N. vermiculata*)	GQ853068	2005		+			
老兵诺卡菌 (*N. veterana*)	AY171039	2001	Yes			+	
酒红诺卡菌 (*N. vinacea*)	DQ659919	2002				+	
伤口诺卡菌 (*N. vulneris*)	JN705252	2015				+	
华莱士诺卡菌 (*N. wallacei*)	GQ853074	2006	Yes				+
山梨诺卡菌 (*N. yamanashiensis*)	DQ659920[d]	2004		+	+		

注：[a] 已发布的案例不足 4 个；[b] 眼部疾病；[c] 未见有效描述(LSPN)；[d] 该菌种的模式菌株含有 16S rRNA 基因的多个不同拷贝

(六)克罗彭斯特菌属(*Kroppenstedtia*)

已报道的14株象牙色克罗彭斯特菌(*K. eburnea*)临床分离株,大多数来源于血液[61]或其他无菌体液,1株来源于皮肤,它们的临床意义均不清楚。由于大多数菌株分离自无菌体液,此处讨论该菌属的目的是期待将来能够确定其真正的临床意义。

通过部分16S rRNA测序及基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术对这些菌株进行了鉴定,并对其中11株进行了抗菌药物敏感性试验,均对大多数试验药物敏感,但对克拉霉素耐药。象牙色克罗彭斯特菌不耐酸,金胺O(auramine O)不着色,报道未提及是否存在气生菌丝[61]。

(七)劳森菌属(*Lawsonella*)

劳森菌属中唯一的菌种——克利夫兰劳森菌(*L. clevelandensis*),已经从免疫功能低下患者的脊柱、腹膜、乳腺及肝脓肿中分离到。除1个患者外,其余患者均有2型糖尿病。因为该病原体是苛养菌(培养要求氧分压小于1%,并且5~7天才出现肉眼可见的增长),它作为一种机会性致病菌很容易被忽略[12]。

(八)诺卡菌属

诺卡菌属(*Nocardia*)细菌感染通常由创伤相关细菌侵入或通过吸入方式导致,后者好发于免疫功能低下患者,并在肺部形成感染灶。诺卡菌也可引起肺外身体各部位感染,肺外感染通常由肺部原发病灶经血行播散所致,脑部是最常见的继发感染部位[62]。各种诺卡菌也可导致角膜炎和其他眼部感染,然而其种水平鉴定并不都准确可靠[63]。此外,有少数导管相关性诺卡菌感染病例报道,但涉及的确切的种并非总能得到清晰鉴定[64]。最近有1例证据充分的由皮疽诺卡菌引起的导管相关性感染病例报道[65]。

1988年,Wallace及同事提供了一个具突破性的临床上有用的致病性诺卡菌分离株分类方法[42]。他们将与星形诺卡菌表型相似的细菌分成6种不同的药物模式类型和另一种混合型。根据最新的分子特征,这组后来被称为星形诺卡菌复合群(*Nocardia asteroides* complex)的微生物被描述划分成许多不同的菌种,包括脓肿诺卡菌(*Nocardia abscessus*)(药物模式Ⅰ)、新诺卡菌(*Nocardia nova*)(药物模式Ⅲ)、华莱士诺卡菌(*Nocardia wallacei*)(药物模式Ⅳ)、皮疽诺卡菌(*Nocardia farcinica*)(药物模式Ⅴ)、圣乔治诺卡菌(*Nocardia cyriacigeorgica*)(药物模式Ⅵ),以及药物模式Ⅱ菌株。其他新的诺卡菌菌种不断地出现,按照目前的种定义标准,毫无疑问,将来会有更多的种被描述。

鉴于目前的文献状态,只可能就不同菌种地理分布及其疾病相关性做最具试探性的陈述。虽然种的准确鉴定可对菌株可能的抗菌药物敏感性模式进行预测,但如今准确鉴定菌种要求使用分子生物学方法[62]。尽管如此,无论是否采用分子生物学技术,推荐对所有具临床意义的分离株进行药敏试验。目前,临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute,CLSI)文件列出了最常分离到的诺卡菌菌种的典型药物敏感性模式[66]。

当前得到公认的92个诺卡菌菌种中,54种报道为人类分离株,其他几种报道为动物病原菌。重要的是,由于未能采用最佳的鉴定方法,许多感染报道,甚至近期文献报道中的分离株,并未得到正确鉴定。

1. 脓肿诺卡菌(*Nocardia abscessus*) 脓肿诺卡菌2000年由Yassin等正式命名[67]。菌株ATCC 23824,药物模式Ⅰ型星形诺卡菌的参考菌株[68],经16S rRNA基因测序和DNA-DNA杂交证实为脓肿诺卡菌菌株中的一株。在1988年对78株各种来源的临床诺卡菌分离株抗菌药物敏感性模式研究中,Wallace等注意到,20%的菌株为药物模式Ⅰ型[42]。在给该菌种命名的报道中,有几株菌株来源于脓肿,随后,来自日本的报告报道了几株来源于肺部及一株来源于脑脓肿的菌株[69]。德国也报道了2株:一株来源于心包液[70],另一株来源于外伤伤口[71]。最新的病例包括1例获得性免疫缺陷综合征患者的播散性感染[72]。

脓肿诺卡菌预期抗菌药物敏感性模式见表30-4。

表 30-4 常见诺卡菌属菌种的抗菌药物敏感性模式[a,b]

菌种	AMK	AUG	CRO	CIP	CLR	IMP	LNZ	MIN	SUL	TOB
脓肿诺卡菌	S	S	S	R	R	V	S	V	S	V
巴西诺卡菌	S	S	V	R	R	R	S	S	S	S
圣乔治诺卡菌	S	R	S	R	R	S	S	V	S	S
皮疽诺卡菌	S	S	R	S	R	V	S	V	S	R
新诺卡菌复合群[c]	S	R	S	R	S	S	S	V	S	R
豚鼠耳炎诺卡菌	S	R	R	S	V	R	S	V	S	V
假巴西诺卡菌	S	R	V	S	S	R	S	R	S	S
德兰士瓦诺卡菌复合群[d]	R	V	S	S	R	V	S	V	S	R

注：[a] 来自 CLSI M62[66]。[b] AMK. 阿米卡星；AUG. 阿莫西林-克拉维酸；CRO. 头孢曲松；CIP. 环丙沙星；CLR. 克拉霉素；IMP. 亚胺培南；LNZ. 利奈唑胺；MIN. 米诺环素；SUL. 磺胺类药物，包括甲氧苄啶-磺胺甲噁唑；TOB. 妥布霉素；S. 敏感；R. 耐药；V. 可变的。[c] 包括非洲诺卡菌、青叶町诺卡菌、茜养诺卡菌、克鲁切克诺卡菌、新诺卡菌、老兵诺卡菌。[d] 包括布氏诺卡菌、德兰士瓦诺卡菌、华莱士诺卡菌

2. 星形诺卡菌和"星形诺卡菌复合群" 星形诺卡菌导致人类感染的报道不可胜数，可能已被认为是最常分离到的人类致病性诺卡菌菌种。然而，迄今为止，对归属于该菌种的致病性菌株进行分子分析显示所有菌株均属于其他已命名或至今仍未命名的菌种。目前认为，严格意义上的星形诺卡菌（*N. asteroides sensu stricto*）很少致病。

"星形诺卡菌复合群"用于描述一群与星形诺卡菌（*N. asteroides*）模式菌株表型类似的微生物，但目前已有关于该复合体内几个不同种的描述，导致该复合群的确切指代现已不明确。鉴于目前分子方法鉴定诺卡菌菌株的能力，应避免使用"星形诺卡菌复合群"一词。无论何时使用"复合群"这一术语，最好首先清晰地说明复合群内所想要包含的种，且最好限定于与分子基础相关、有相似表型特征的种群，符合这样条件的种群包括新诺卡菌复合群（*N. nova* complex）和德兰士瓦诺卡菌复合群（*Nocardia transvalensis* complex）。

3. 巴西诺卡菌（*Nocardia brasiliensis*） 巴西诺卡菌似乎是西半球，特别是墨西哥，放线菌性足菌肿（见前面"马杜拉放线菌属"）最常见的病因[73]。巴西诺卡菌可能存在于世界各地，澳大利亚[74]、西孟加拉邦（印度）[75]、欧洲[76]均有感染报道，北美洲[77]也有许多报道。除引起足菌肿外，据报道巴西诺卡菌还可引起各种皮肤症状，包括蜂窝织炎、脓肿、皮肤淋巴感染。几乎所有的病例均由创伤引起，包括刺伤[76]、猫抓伤[78]和昆虫叮咬[79]。大多数创伤相关性感染发生在免疫功能正常的个体。播散性感染也有报道，通常起源于肺部病灶[77]，这种感染更可能发生于免疫功能受损患者[80]，有时也可发生于免疫功能正常患者，如 1 例肺部病灶播散引起的脑脓肿病例[81]。然而，1995 年以前报道的由巴西诺卡菌引起的大多数侵袭性感染病例及某些皮肤感染病例，几乎可以肯定是由假巴西诺卡菌（*Nocardia pseudobrasiliensis*）引起的（见下文）。

巴西诺卡菌预期抗菌药物敏感性模式见表 30-4。

4. 短链诺卡菌（*Nocardia brevicatena*）/寡食诺卡菌（*Nocardia paucivorans*） 1997 年，Brown 等提出应考虑将同时具有异常药物敏感性模式和 65 000 Da 热休克蛋白（heat shock protein，HSP）基因扩增部分 3 个不同限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism，RFLP）模式之一的诺卡菌菌株组合成短链诺卡菌复合群（*Nocardia brevicatena* complex）[82]。这群细菌包括 19 株来自美国、10 株来自澳大利亚的临床分离株和 3 株短链诺卡菌 ATCC 参考菌株。但无该类微生物后续临床分离株或分类研究的报道。

寡食诺卡菌由 Yassin 等在 2000 年根据一株从慢性肺疾病患者呼吸道分离到的菌株进行了描述[83]。16S rRNA 基因测序表明，它与短链诺卡菌具有 99.6%的序列相似性，但 DNA-DNA 杂交结果显示它们为不同的种。基于相似的表型特性和抗菌药物敏感谱，有时可考虑将寡食诺卡菌、短链诺卡菌以及属于未命名的星形诺卡菌药物模式Ⅱ群的菌株[42]，同归于寡食诺卡菌/短链诺卡菌复合群[62]。试图鉴定寡食诺卡菌/短链诺卡菌复合群中的分离株到菌种水平已超出了目前大多数临床实验室的能力。

寡食诺卡菌已分别从一个免疫功能受损的脑诺卡菌病患者脑脊液[84]、一个免疫功能正常患者颅内脓肿[85]和一个患者的二尖瓣[86]分离到。86株来自比利时的临床诺卡菌菌株中有2株(2.3%)经鉴定属于该菌种[87]。

5. 圣乔治诺卡菌 圣乔治诺卡菌根据从一个慢性支气管炎患者痰中分离到的一株菌株描述[88]。随后分离到的该菌种菌株分别来自一个免疫功能受损患者的脑脓肿[89]和一个溺水后肺炎患者,从该患者身上同时还分离到皮疽诺卡菌和其他病原菌[90]。据文献报道,来自泰国的96株[91]和比利时的86株[87]临床诺卡菌菌株,分别有13株(14%)和13株(15%)为圣乔治诺卡菌。该菌种模式菌株16S rRNA序列(1400bp)与星形诺卡菌药物模式Ⅵ参考菌株(ATCC14759)完全相同[68,92],随后DNA-DNA杂交确定该参考菌株和圣乔治诺卡菌属于同一个种[93]。在最初描述不同星形诺卡菌(*N. asteroides*)药物模式类型时,药物模式Ⅵ型菌株是最常分离到的菌株(35%)[42]。圣乔治诺卡菌可能是最常见的人类诺卡菌病原体,至少在放线菌性足菌肿相对罕见的地区如此。虽然圣乔治诺卡菌被认为是一个新现病原体[94],但它实际上是一种相对普通的且为人长期所熟知的病原菌,其命名最近才获得权威组织认可和批准。事实上,以前报道为星形诺卡菌的很多菌株几乎可以肯定属于这个种。

圣乔治诺卡菌预期抗菌药物敏感性模式见表30-4。

6. 皮疽诺卡菌 最初由Wallace等描述属于星形诺卡菌药物模式Ⅴ型的一群微生物[42],随后发现它属于皮疽诺卡菌[95]。据报道,体外对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(复方磺胺甲噁唑)耐药的皮疽诺卡菌菌株,单用美罗培南[96]或合用利奈唑胺和米诺环素治疗有效[97]。皮疽诺卡菌可能特别容易引起播散性疾病。据Wallace等报道,在30个疾病程度已知的患者中,57%为播散性感染,1/3涉及中枢神经系统[95]。大多数皮疽诺卡菌感染患者,特别是播散性感染患者,都存在某种形式的免疫功能受损[95],但在免疫功能明显正常的人群中也可发生皮肤及其他感染[98]。有综述报道,肺部感染常见,59.7%的患者肺受累[98]。经分子生物学分析验证,皮疽诺卡菌已从脑脓肿[99]、血液[99]、角膜炎病例[100]和1例耳蜗植入术感染患者[101]中分离得到,也曾从1例囊性纤维化患者的支气管肺泡灌洗液中分离到[102]。据报道,96株来自泰国[91]和86株来自比利时[87]的临床诺卡菌菌株中,分别有34株(35%)和38株(44%)属于皮疽诺卡菌。

最近一项关于实体器官移植患者的诺卡菌属感染的欧洲多中心研究表明,相较于诺卡菌属的其他菌种,皮疽诺卡菌更易引起脑部、皮肤及皮下组织感染[103]。

新近描述的菌种克氏诺卡菌(*Nocardia kroppenstedtii*)几乎与皮疽诺卡菌无法区分,两者16S rRNA基因序列相似度为99.8%,仅有3种核苷酸不同[104]。用一种测量热变性温度的拟建方法对克氏诺卡菌和皮疽诺卡菌模式菌株的DNA-DNA相关性进行了评估[105],结果表明两者属于不同的种。不过,基于2个菌种16S rRNA基因序列的相似度和拟建方法对DNA-DNA相关性的评估,要确定克氏诺卡菌是否确实是与皮疽诺卡菌不同的菌种,还需进一步研究。

皮疽诺卡菌预期抗菌药物敏感性模式见表30-4。

7. 新诺卡菌 新诺卡菌(*N. nova*)1982年由Tsukamura描述,作者通过几个表型试验将其与星形诺卡菌进行区分[106],后来DNA-DNA杂交确证新诺卡菌为一个独立的且与众不同的种[107]。Wallace等发现,78株临床分离株中,18%符合以对氨苄西林、红霉素敏感但对羧苄西林耐药为特征的药物敏感模式Ⅲ类型[42]。随后一项涉及223株临床分离株的研究中,生化和药敏试验表明17%的菌株与新诺卡菌模式菌株有相似的特征,包括Ⅲ型药物敏感模式,因此,这些菌株当时均被当作新诺卡菌菌株[108]。在可获得临床信息的患者中,35%被认为存在播散性感染,可从包括血液、肺、中枢神经系统、皮肤和软组织、关节和角膜在内的多部位分离到细菌。文献报道了1例发生于HIV阳性患者的由新诺卡菌导致的上肢孢子丝菌病样(upper extremity sporotrichoid)诺卡菌病(nocardiosis),患者在野外工作时拇指外伤持续未愈[109];Hamdad等报道了1株经16S rRNA测序鉴定的新诺卡菌分离株,分离自合并有椎间盘炎和腰肌脓肿的患者[110]。

调查显示,通过包括抗菌药物敏感谱在内的表型试验以及*hsp65*基因RFLP模式检测鉴定为新诺卡菌的微生物,实际上还可能属于新诺卡菌以外的其他种,包括非洲诺卡菌(*Nocardia afri-*

cana)、克鲁切克诺卡菌(*Nocardia kruczakiae*)和老兵诺卡菌(*Nocardiav eterana*)[111]。这些菌种仅能通过基因测序相互区分或与严格意义上的新诺卡菌(*N. nova sensu stricto*)区分。HSP 和*secA1* 基因序列数据的相似性分析总是将这些菌种与严格意义上的新诺卡菌分在同一组,说明它们具有相当大的遗传相似性[112]。16S rRNA、HSP 和*secA1* 基因的相似性分析表明,青叶町诺卡菌(*Nocardia aobensis*)和苛养诺卡菌(*Nocardia elegans*)也属于新诺卡菌复合群(*N. nova* complex),但尚未对这 2 个种与复合群内其他种的表型特征相似性进行检测。新诺卡菌复合群内所有种(包括青叶町诺卡菌和苛养诺卡菌)都已从人体分离到或与人类疾病有关,仅通过表型试验鉴定属于其中某个种的菌株,最好报告为新诺卡菌复合群成员菌。

新诺卡菌复合群的预期抗菌药物敏感性模式见表 30-4。

8. 豚鼠耳炎诺卡菌(*Nocardia otitidiscaviarum*) 豚鼠耳炎诺卡菌 1924 年由 Snijders 首次描述,其菌株最初分离自一只受感染的豚鼠中耳,因此,有段时间它被称为 *N. caviae*[113]。Clark 等回顾分析了 28 例由该菌引起的皮肤感染病例,包括几例足菌肿,可获得临床信息的病例大多与外伤有关[114];也有一些其他部位感染的病例报道,包括 1 例脑脓肿[115]、1 例脓胸感染[116]、1 例导管相关性感染[117]、播散性感染[118]和空洞性肺炎[119]。在一项有关大量临床菌株的分子生物学研究中,经表型鉴定为豚鼠耳炎诺卡菌的 9 株菌株分析得到几个序列[120],该结果提示在这个种群内可能存在几个不同的种,但一些结果也表明个别菌株可能包含两个或者多个不同的 16S rRNA 基因拷贝。

豚鼠耳炎诺卡菌的预期抗菌药物敏感性模式见表 30-4。

9. 假巴西诺卡菌 1995 年,Wallace 等[121]报道了鉴定为巴西诺卡菌的微生物的一个亚组,该菌有时分离自皮肤感染但主要与非皮肤侵袭感染有关,该亚组菌株似乎属于另一个分类单元,第二年即被正式命名为假巴西诺卡菌[122]。该菌导致的大多数感染发生于免疫功能受损患者,北美洲、南美洲、日本和澳大利亚均有相关病例报道[121,123-124]。

不像真正的巴西诺卡菌菌株,大多数假巴西诺卡菌菌株可水解腺嘌呤,对环丙沙星和克拉霉素敏感,对米诺环素耐药;此外,这 2 个菌种在分枝菌酸模式和 16S rRNA、HSP 及*secA1* 基因序列上也不相同。大多数以前归因于巴西诺卡菌的非足菌肿感染病例很可能由假巴西诺卡菌导致,详见前文"巴西诺卡菌"。

假巴西诺卡菌的预期抗菌药物敏感性模式见表 30-4。

10. 德兰士瓦诺卡菌(*Nocardia transvalensis*)和德兰士瓦诺卡菌复合群(*N. transvalensis* complex) 德兰士瓦诺卡菌(*N. transvalensis*)最早在 1927 年根据分离自 1 例足菌肿非洲患者的 1 株菌株进行描述[125]。1997 年,Wilson 等报道的一项含有 58 株来自美国和澳大利亚的临床菌株的研究表明,该菌群对包括阿米卡星在内的所有氨基糖苷类药物耐药,这是该菌群的特征[126]。采用生化和分子生物学方法可将分离出的菌株分成 4 个不同的群组,其中一个群组菌株数占所有菌株数的 53%,其所有菌株均分离自美国患者,并与 Wallace 等定义分类为星形诺卡菌药物模式Ⅳ型的菌株类似[42],该群组菌株后来被权威组织命名为华莱士诺卡菌[127](见下文)。另一群组(占所有菌株数的 17%)包含与德兰士瓦诺卡菌模式菌株类似的菌株。报告也对另外 2 个群组—新分类 1(占所有菌株数的 14%)和新分类 2(占所有菌株数的 16%)进行了定义,澳大利亚菌株属于严格意义上的德兰士瓦诺卡菌或新分类 1,属于新分类 1 的菌株现在已有种名——即布氏诺卡菌(*Nocardia blacklockiae*)[127]。因具有相似表型和分子特征,Wilson 提议可考虑将上述 3 个种,以及尚未命名的新分类 2 组合成德兰士瓦诺卡菌复合群。基因测序可以使这些菌种彼此区分,也可区分于新描述的对阿米卡星耐药的新菌种——耐阿米卡星诺卡菌(*N. amikacinitolerans*)[128]。

有许多描述来自临床标本的德兰士瓦诺卡菌分离株的文献报道,其中很多菌株鉴定仅基于少量表型试验,鉴于上述相关种的相似性,大多数报道中对种的划分是否准确尚不明确。McNeil 等报道了从 16 个患者分离到的属于该种的菌株[129],其中 10 个患者分离株有临床意义,其他菌株被认为是定植菌或临床意义不确定。德兰士瓦诺卡菌感染可累及各种部位,有些为播散性感染,部分患者存在免疫功能受损;也有其他少数按分

子特征归属于德兰士瓦诺卡菌复合群的播散性感染病例报道，包括 1 例癌症患者脑脓肿[130]、1 例心脏移植患者脑和皮肤感染[131]，以及 1 例组织细胞增多症 X 患者肺部感染和皮下脓肿[132]。日本报道了 3 株属于该复合群的临床菌株[133]。最近报道了 1 例资料翔实的由德兰士瓦诺卡菌引起的肺炎病例，感染者为 1 例囊性纤维化患者[134]。

采用 16S rRNA 基因测序鉴定德兰士瓦诺卡菌复合群成员菌时应注意，GenBank 数据库已提交有大量德兰士瓦诺卡菌序列，很多序列与华莱士诺卡菌模式菌株的亲缘关系比与德兰士瓦诺卡菌模式菌株的更近。

德兰士瓦诺卡菌复合群的预期抗菌药物敏感性模式见表 30-4。

11. 老兵诺卡菌 老兵诺卡菌的首次描述基于 1 例肺损伤患者的支气管灌洗液分离株，但该菌株被认为没有临床意义[135]。随后，老兵诺卡菌被认为是足菌肿[136]、3 例肺疾病患者[137]、1 例 HIV 患者腹水感染[138]、1 例糖尿病患者脑脓肿[139]及 1 例癌症患者血液感染[140]的病原体；另有报道，3 株临床分离株中的 2 株显示为肺疾病病原体，且研究发现这些菌株的抗菌药物敏感模式与非洲诺卡菌和新诺卡菌完全一致[141]，表明种鉴定不能仅通过药敏试验最终确定；研究同时发现，所研究菌株与非洲诺卡菌和新诺卡菌模式菌株 16S rRNA 基因相似度分别为 99.0%和 97.7%。老兵诺卡菌为包含在新诺卡菌复合群中的种之一，详见前文“新诺卡菌”，HSP，*secA1* 和 16S rRNA 基因测序将老兵诺卡菌和复合群中其他成员菌归入同一组群。老兵诺卡菌预期抗菌药物敏感性模式与新诺卡菌复合群细菌一致（见前文）。

12. 华莱士诺卡菌 华莱士诺卡菌是德兰士瓦诺卡菌复合群中最常分离到的一个菌种，2008 年，对其特征描述获权威组织认可[127]。5 株痰标本临床分离株（其中 1 株也同时从胸腔积液中分离到）16S rRNA、HSP 和 *secA1* 基因测序显示它们与华莱士诺卡菌模式菌株具有≥99.8%的序列相似度。该种最初被 Wallace 等分类为星形诺卡菌药物模式Ⅳ，其菌株数占 78 株经表型鉴定为星形诺卡菌菌株的 5%，独具阿米卡星耐药特性[42]。华莱士诺卡菌预期抗菌药物敏感性模式与德兰士瓦诺卡菌复合群细菌一致（见前文）。

（九）拟诺卡菌属（*Nocardiopsis*）

拟诺卡菌属微生物导致的感染非常少，但几乎都与达氏拟诺卡菌（*Nocardiopsis dassonvillei*）有关。已从血液、足菌肿、创伤性的皮肤感染和鼻前庭脓肿中分离出达氏拟诺卡菌[142-144]。

（十）红球菌属

红球菌属中最常分离到的致病菌是马红球菌；最近有报道分别从血液和肝病变中分离到类棒杆菌红球菌（*Rhodococcus corynebacterioides*）[145]和（*Rhodococcus faciens*）[146]。有证据表明，马红球菌可能是几个不同种的复合群[147]。该菌长期以来被认为是一个重要的马肺部病原体（菌种也因此得名）[148]。最初关于马红球菌［当时报道为马棒杆菌（*Corynebacterium equi*）］引起人类疾病的报道来自一个使用高剂量类固醇药物的肺脓肿患者，发病前不久曾在一个受动物粪便污染的畜牧场短暂工作过[149]。食草动物粪肥为该菌提供了理想的生长条件，微生物吸入可能是马感染的主要方式[148]，也可能是人感染的主要途径。其他可能的感染途径为直接接种和经口摄入[150]。大多数马红球菌感染者存在免疫功能受损，至少到最近，约 2/3 的感染者也是 HIV 感染者[150]。

马红球菌感染虽可累及身体任何部位，但约有 80%免疫功能受损患者及至少 40%免疫功能正常患者累及肺部；据报道，>80%免疫功能受损患者和约 30%免疫功能正常患者可呈现菌血症[150]。肺空洞损害常见。Mulè 等报道了 5 例患者，其中几位是免疫功能正常，且伴有软化斑（malacoplakia）疾病的患者，即一种含有常称为类似恶性肿瘤的软斑小体（Michaelis-Gutmann bodies）的同心层状嗜碱性结构的组织细胞聚集性疾病的患者，并从中分离到马红球菌[151]。目前已确定马红球菌 2 个质粒编码的毒性相关性抗原（VapA 和 VapB），产 VapA 抗原的菌株是导致马患病的主要也可能是唯一的原因，但从人感染病例中已分离到产 VapA、VapB 或 2 种抗原都不产的菌株[152]。如果鉴定评估不仔细，马红球菌很容易被错误鉴定为棒状杆菌而被认为无关紧要（图 30-2h）。有报道描述了 2 例死于马红球菌暴发感染的病例，虽多次血培养阳性，但最初均被错误鉴定

为棒杆菌属细菌[153]。马红球菌导致的感染在结核分枝杆菌高度流行的地区也会被误诊[154]。

(十一)慢反应脂肪酸菌属

慢反应脂肪酸菌属由光滑慢反应脂肪酸菌(*Segniliparus rotundus*)和褶皱慢反应脂肪酸菌(*Segniliparus rugosus*)2个种组成,最初均从临床样本培养得到,但除了来源于"人体非无菌部位",并无关于这些菌株临床意义的信息[29]。这些菌种的分离株分离自呼吸道标本,并且与冢村菌属菌株和快速生长的分枝杆菌在显微形态和菌落形态上具有相似性[29](图30-2m和图30-3m、n)。有关褶皱慢反应脂肪酸菌的分离培养报道似乎表明该菌易感染囊性纤维化患者,不过,近期有1例报道称从免疫功能正常的非囊性纤维化患者中分离到褶皱慢反应脂肪酸菌菌株[155];另一个来自澳大利亚的报道称从囊性纤维化患者痰分枝杆菌培养物中分离到1株褶皱慢反应脂肪酸菌[156]。最近报道了1例由光滑慢反应脂肪酸菌导致的非囊性纤维化支气管扩张的肺炎病例[157]。

(十二)链霉菌属

链霉菌属微生物导致的最常见感染性疾病为足菌肿(见前文"马杜拉放线菌属"),其中最常提及的病原菌为索马里链霉菌(*Streptomyces somaliensis*),但许多报告所采用的鉴定方法,尚无法明确鉴别出该菌种。最近报道了1例通过16S rRNA基因测序鉴定出白色链霉菌(*Streptomyces albus*)导致放线菌性足菌肿的病例[158]。有少数报道暗示链霉菌属的其他菌种偶尔也可致病。在由比基尼链霉菌(*Streptomyces bikiniensis*)(导管相关的)[159]及热普通链霉菌(*Streptomyces thermovulgaris*)[160]引起的菌血症的病例报告中,分离株也是通过16S rRNA基因测序鉴定的。从非足菌肿损伤部位分离到的大多数链霉菌属菌株可能由污染或定植所致,但该属微生物偶尔也可引起足菌肿以外的其他疾病,包括角膜炎[161]和肺炎[162]。由于获权威组织认可描述的链霉菌菌种数量巨大,且许多菌种缺乏有关临床意义的信息,大多数感染病例鉴定至属水平就可能足以满足临床需要。

(十三)冢村菌属

如果不采用分子鉴定方法,由冢村菌属引起的感染可能会归因于其他病原菌,例如,快速生长的分枝杆菌、棒杆菌属或红球菌属。据报道,冢村菌属引起的血流感染大多与静脉导管相关[163],但也可发生于没有外源性异物的免疫功能正常患者[164]。眼部感染通常由各种各样的冢村菌属引起,包括溶酪氨酸冢村菌(*Tsukamurella tyrosinosolvens*)、泡沫冢村菌(*Tsukamurella spumae*)、肺冢村菌(*Tsukamurella pulmonis*)和香港冢村菌(*Tsukamurella honkongensis*)[165,166]。溶酪氨酸冢村菌可引起角膜炎、菌血症及导管相关性感染[165]。斯氏冢村菌(*Tsukamurella strandjordae*)[167]和肺冢村菌可引起血流感染[168]。

(十四)威廉姆斯菌属

威廉姆斯菌属第一株临床分离株来源于一个主动脉瓣置换术后伴双侧肺泡炎性浸润患者的保护性支气管毛刷标本,革兰染色后显微镜下可见大量的阳性杆菌,液体培养至菌量>1000 CFU/ml后,经16S rRNA基因测序鉴定为壁威廉姆斯菌(99.9%的序列相似度)[169]。有报道称从人血液标本中分离到2株挑剔威廉姆斯菌(*Williamsia deligens*),但并未提供相关临床信息[170]。最近一篇报道描述了从孕妇的血液中分离出另一种菌种——食丝氨酸威廉姆斯菌(*Williamsia serinedens*)[170]。

(十五)其他属

某些其他属的需氧放线菌在人类疾病中也扮演了一定的角色,但临床实验室很少碰到。嗜热需氧放线菌(thermophilic aerobic actinomycetes)中的糖单胞菌属、糖多胞菌属和高温放线菌属微生物为过敏性肺炎病原体,空气采样时可能会采集到这些微生物的孢子,必要时分子生物学方法有助于种水平鉴定[171-172]。最近描述的一株痰标本分离株是高温放线菌科中的一个新的属、种——活力链孢子菌(*D. activa*),但其病原学意义尚不清楚[7]。

五、标本的采集、运输和储存

在温带地区,呼吸道是需氧放线菌进入人体最常见的通道,因而也成为免疫功能受损宿主诺卡菌感染的首要部位。痰是最容易获取的肺部标

本，于不同日期多次收集新鲜晨痰标本进行检测[173]有助于最大程度提高病原体检出率；从多个标本分离到同一需氧放线菌有助于明确其临床意义[174]。然而，即使是诊断明确的肺部感染病例，也难以从痰中分离到诺卡菌或其他需氧放线菌[14]，这可能是由于痰标本中病原体数量偏低，抑或是由于被标本中其他生长更快的细菌所抑制。必要时可能需要更多侵入性操作，如支气管肺泡灌洗、肺穿刺甚或开放肺组织活检，以获得明确性诊断[14]。约44%原发性肺部感染病例确诊需要采取上述侵入性操作[74]。为最大程度分离诸如红球菌等趋向聚集定位于巨噬细胞内的细菌，可能必须采集富含巨噬细胞的标本[20]。

脓肿或足菌肿渗出物应当用无菌容器转送到实验室，以肉眼和显微镜检查其特征性颗粒物，并进行涂片和培养；对于弥散性皮损或继发于创伤的局部小皮损病例，皮肤组织活检有助于病原学诊断。不推荐用拭子采集标本，其纤维可使阅片及解释变得困难[173]。

对免疫功能受损患者，需氧放线菌尤其是诺卡菌几乎可播散至任何器官。如果可以获取组织活检标本或抽吸物，则可能是评估是否存在需氧放线菌的最佳标本。通常情况下，无菌体液标本应用无菌容器采集并立即送至实验室；对于脑部感染患者，即使存在广泛脑损伤，诺卡菌也很少能从脑脊液中检出，因为细菌本身往往局限于脑脓肿内部。血标本应直接接种到血培养基，许多商品化的血培养系统均支持各种诺卡菌培养。虽然诺卡菌属和冢村菌属细菌被认为会是导管相关性菌血症的病原体，但其他需氧放线菌也可能与导管相关性感染有关，潜在感染性导管尖应用无菌容器转送到实验室以合适方法培养。

任何一个可疑需氧放线菌感染病例，临床告知实验室目前的疑似诊断结果极其重要，这将确保标本得到恰当的处理，包括正确制备直接涂片、样本接种到合适的培养基，并在合适的温度下孵育更长的时间(最少2周，3周更好)。

所有标本应遵循第19章样本采集和运送程序，立即送至实验室。

六、直接检测

(一)显微镜检测

对怀疑含有需氧放线菌的临床标本进行仔细的显微镜检测极其重要。如果显微镜下观察到诺卡菌和其他需氧放线菌特征性形态，应提醒实验室工作人员将标本接种到合适的培养基并选择适当的温度延长孵育时间；此外，在标本中直接观察到细菌有助于培养结果的解释，和菌落生长涂片相比，标本直接涂片可显现更具特征性的诊断形态。

痰、引流液及抽吸物均可直接涂片，而单位细胞含量少的液体标本，如支气管肺泡灌洗液或正常无菌体液，涂片或接种培养基前需浓缩处理，例如，5 ml的标本2800 *g* 离心10 min后，沉淀物即可用于涂片、接种，也可用细胞离心机制备涂片；组织标本可用组织匀浆或印片(touch preps)制备涂片。革兰染色和改良抗酸染色是临床实验室2种重要的染色方法，获取的标本应直接用2种方法进行涂片镜检。使用特殊染色(包括菲特染色、Grocott-Gomori六胺银染色)对固定后的组织进行组织病理学检查，也可揭示需氧放线菌各属细菌的存在[175]。

需氧放线菌革兰染色形态因属而异，菌体显现为革兰阳性杆菌，形状从球状至杆状不等，也可能呈丝状和分支状，取决于细菌种类及其在感染组织中所处生长阶段(图30-3)。需氧放线菌显微形态汇总见表30-1。

对标本直接进行改良抗酸染色比菌落培养生长后进行改良抗酸染色更能准确反映细菌真实的部分抗酸属性。与分枝杆菌染色用3% HCl作为脱色剂相比，改良抗酸染色使用更弱的脱色剂($1\% H_2SO_4$)，应严密监测染色过程中的脱色步骤以降低过度脱色或脱色不足风险。染色试剂制备和染色方法详见第20章。鉴于改良染色技术难以标准化，标本染色涂片时必须同时设置阴性和阳性质控对照，质控玻片可用链霉菌属(阴性质控)和诺卡菌属(阳性质控)细菌悬液制备；涂片应由经验丰富的实验室工作人员评估，报告结果前需对染色质量进行评估。已知戈登菌、诺卡菌、红球菌及冢村菌，可能还有迪茨菌改良抗酸染色呈部分抗酸性，慢反应脂肪酸菌呈强抗酸性。

阅片时，应特别注意标本中的细胞成分(图30-3k和l)。诺卡菌属细菌镜检视野中经常伴有多形核白细胞[62]；有时可在巨噬细胞和单核细胞内发现被吞噬的革兰阳性或改良抗酸染色阳性细菌，在改良抗酸染色涂片中，这些细菌菌体因在非

抗酸或弱抗酸杆状体内部有强抗酸颗粒而呈"串珠样"[13,20]。

对疑似放线菌性足菌肿病例，应将抽吸物涂布于带盖的无菌培养皿中肉眼检查是否存在颗粒物。由诺卡菌属细菌导致的感染，颗粒较小(80～130 μm)，可能呈肾形，周边具棒球棒状结构，颜色通常为黄色至橙色[176-177]；然而，在最近一项由巴西诺卡菌引起的放线菌性足菌肿的报道中，观察到了巨大的白色颗粒，其可能与感染病原体的特定亚群有关[178]。马杜拉放线菌引起的感染，颗粒呈黄白色，大至肉眼可见，显微镜下周围可见"假棒球棒(pseudoclubs)"结构区域[176]；由白乐杰马杜拉放线菌引起的感染，颗粒呈红色至粉红色[176]。颗粒应洗净、粉碎，用粉碎物制备涂片，接种合适的培养基。颗粒最常见于由巴西诺卡菌或放线菌属细菌引起的感染中，但也可见于诺卡菌其他种引起的感染[62]。没有足够数据表明可用颗粒有无或颗粒颜色进行精确的种，甚或是属水平的病原菌鉴别。

(二)核酸检测

一些作者报道可用分子生物学方法从临床标本中直接检测诺卡菌属，靶标包括 65 kDa HSP 基因[179]、16S rRNA 基因[180-181] 和 *secA1* 基因(G. Fahle,2011)。当标本经形态学检测提示可能含有该属细菌时，这些核酸检测技术有潜力为诺卡菌病提供快速的实验室诊断，但需要进一步评估这些技术的敏感性和临床实用性。

Isotalo 等描述了一种用原位杂交技术从福尔马林固定、石蜡包埋组织标本中检测诺卡菌的方法，与标准组织学染色相比，该方法敏感性为77%[182]。

七、分离程序

大多数需氧放线菌可用血琼脂、巧克力琼脂、脑心浸出液琼脂、萨布罗葡萄糖琼脂和 Lowenstein-Jensen 培养基培养，刚果嗜皮菌在萨布罗葡萄糖琼脂或 Lowenstein-Jensen 培养基上可能不生长[6]，缓冲活性炭酵母提取物琼脂(buffered charcoal yeast extract agar,BCYE)特别适用于诺卡菌培养。取自无菌部位的标本或浓缩无菌体液标本可直接接种于上述培养基；来自呼吸道、皮肤和其他可能受污染部位的标本，如足菌肿标本，应同时接种选择性培养基，如改良 Thayer-Martin 琼脂[183]及选择性 BCYE(含多黏菌素、茴香霉素及万古霉素或头孢孟多)[184]。添加氯霉素的萨布罗琼脂可能抑制某些诺卡菌的生长，不宜用于选择性培养[185]。据报道，添加头孢他啶和新生霉素的 Mueller-Hinton 琼脂培养基可专门用于马红球菌培养[186]。需氧放线菌也可在液体培养基(如用于分枝杆菌培养的肉汤培养基)中生长，孵育后菌落可呈固体颗粒状，可用移液管捕获后涂布到固体培养基上培养，也可用 2 片载玻片压碎颗粒，干燥后染色(Y. Shea,2007)。

需氧放线菌培养应像真菌培养一样，确保在较长一段时间内孵育培养物并定期检查菌落生长情况。培养时应同时接种 2 个 BCYE 平板(无菌部位标本)或选择性 BCYE 平板(呼吸道或其他可能受污染部位标本)，其中一个 BCYE 或选择性 BCYE 平板置于 30℃培养，另一个置于 35℃，自然环境空气下培养。应注意，链霉菌在 25℃生长最佳，刚果嗜皮菌在 CO_2 含量增加的条件下生长得更好，气生菌丝产生增强[6]，所有培养平板应至少孵育 2 周，3 周更佳，应密封孵育以防止脱水。

采用低 pH 去污染程序对标本进行预处理，可成功去除疑似含有诺卡菌标本的重度污染，即标本用 pH 为 2.2 的 0.2 mol/L HCl 和 0.2 mol/L KCl 溶液以 1∶10 稀释，混合均匀后静置 3～5 min，然后接种到选择性和非选择性培养基上[184]。从 NALC-NaOH 预处理标本中提高诺卡菌属细菌培养阳性率的关键是缩短去污染试剂暴露时间(15 min)，实际上缩短暴露时间也推荐用于分枝杆菌分离培养[187-188]。

从血标本中分离培养需氧放线菌可采用各种商品化血培养系统，包括传统的双瓶系统、双相瓶、自动血培养系统以及细胞溶解-离心系统。采用各种血培养系统，需氧放线菌可在孵育 3～19 天后培养出来，有时还包括后期的转种培养时间[159,189]。根据采用较新血培养系统的研究结果，有推荐认为延长孵育时间不再是必需[190]，然而，这些研究没有证实缩短孵育时间可广泛适用于需氧放线菌的分离。如果怀疑菌血症可能与需氧放线菌有关，建议行真菌血培养(延长孵育周期至少 3 周)，或在常规血培养时间不能延长时，进行后期转种培养。

所有来源的平板培养在孵育的第1周内应每天检视，然后每周检视，最好使用能观察微小菌落的解剖显微镜，对于含有污染微生物的标本，这种镜检尤为重要，因为需氧放线菌很快会被生长更迅速的微生物掩盖。从 Lowenstein-Jensen 或 Middlebrook 培养基上检测分枝杆菌，或者从 BCYE 平板上检测军团菌属（*Legionella*）细菌时，也应特别仔细，因为诺卡菌和其他需氧放线菌也可在这些培养基上生长。

八、鉴定

（一）显微镜下形态

由于显微形态存在属间差异（表 30-1 和图 30-3），对可疑需氧放线菌的革兰染色形态学进行评估是鉴定的第一步。镜检时，应观察足够多的视野，以确定其最常见的形态及观察有时可能存在的稀有分支，应注意不要将直立排列的细菌与真正的分支混淆；丝状菌株进行菌落涂片时，菌丝体可能断裂而显现为杆状或球状[62]。

正确制备及仔细解读改良抗酸染色涂片有助于需氧放线菌微生物的初步鉴定（图 30-3f、g、i、j 和 l），质控玻片、培养物菌落染色应同步进行。采用改良抗酸染色时，玻片背景应该是蓝色，粉红色背景可能系脱色不充分，需要重新脱色。镜检时，应观察能看见单个细菌细胞的区域或有清晰细胞边界的单层细胞区域，紧紧成团聚集在一起的细菌抗酸反应不能代表细菌细胞真实的部分抗酸染色特性，因此要警惕所有细胞均呈抗酸染色阳性的大团细菌细胞。抗酸细胞呈明显红色，被染成紫色或浅粉色的细胞可能是，也可能不是真正的抗酸细胞；一个清晰的阳性抗酸染色反应可能通常仅表现为少量细胞呈明显红色，而大部分细胞呈蓝色，更多时候仅有珠状部分呈抗酸阳性。如果改良抗酸染色结果模棱两可，难以判断，可将细菌转种至富含脂质的培养基，如 Lowenstein-Jensen 培养基或 Middlebrook 7H11 琼脂（增加菌体的脂质含量），培养后重新染色，可获得更清晰的染色结果。随着菌落培养时间延长，抗酸性可能会变得更加明显，据报道，用生长 1～4 周的菌落进行抗酸染色结果最为可靠[191]。偶尔，球菌样链霉菌可呈部分抗酸性，但菌丝呈抗酸阴性。由于改良抗酸染色的结果判读困难，染色结果只能用于初步判定，且必须综合考虑其他试验结果。非常罕见的情况还可见于具有改良抗酸染色阳性特性的某种细菌的单个菌株可能不会呈现阳性染色反应。如果显微和菌落形态与某种需氧放线菌一致，且分离株可能有临床意义，应尝试对该菌株进行鉴定。

（二）玻片培养

玻片培养可能是评价某些属，如无枝酸菌属、拟无枝酸菌属和拟诺卡菌属微生物形态学的最好方法。需氧放线菌各属微生物玻片培养生长的特征差异可能很细小，需要有丰富的形态学差异识别经验才可获得正确的试验结果解读，更多特征性的玻片培养形态学信息可参见参考文献[192]和[193]。

（三）菌落形态

各需氧放线菌菌落外观属间差异极大，甚至同种细菌也存在明显的株间差异（图 30-2）。环境因素，如生长培养基、孵育温度、空气流通、CO_2 含量以及培养时间，都可影响菌落大小、光滑度以及气生菌丝的产生[194]。某些菌种产生可扩散性色素，且色素可能存在株间差异。特定菌落形态信息见表 30-1。

（四）气生菌丝

气生菌丝从菌落表面突出到空气中，对于某些能形成气生菌丝的菌种，可能需要孵育 7～14 天后才能生成明显的气生菌丝。推荐使用解剖显微镜观察气生菌丝。诺卡菌和链霉菌通常产生丰富的气生菌丝，使其菌落呈现特征性的粉末状或天鹅绒状外观（图 30-2c、e 和 l），罕有诺卡菌菌株产生稀疏或不产气生菌丝（图 30-2d 和 g）。部分耐酸的需氧放线菌属中，仅诺卡菌常规性产生气生菌丝。某些需氧放线菌属，孢子的存在及它们在气生菌丝上的相对数量和排列也可为其属的鉴定提供线索[193]。

（五）属的归类

确定一个未知菌株的属，显微和菌落形态的观察尤为重要（表 30-1，图 30-2 和图 30-3）。在评估菌落生长特征时，应观察判断是否存在气生菌丝。诺卡菌和链霉菌通常会产生气生菌丝，然而

其他一些较少分离到的菌属也可显示这种形态学特征(表30-1)。精心制备和解读的改良抗酸染色涂片阳性结果结合气生菌丝的存在,有助于将诺卡菌与其他属细菌鉴别开来。

最近有报道证实,无论传统的还是商品化的生化方法,在菌株属水平的准确鉴定方面均存在不足之处。例如,最初用商品化试条错误鉴定为马红球菌的菌株,进一步研究后发现属于迪茨菌属[54];最初鉴定为红球菌的菌株,后来发现属于冢村菌属[165]。

Laurent等描述了一种基于PCR的鉴定方法,可将诺卡菌属的成员与需氧放线菌其他属成员鉴别开来[195],不清楚该方法是否适用于新描述的诺卡菌菌种与其他属的鉴别。

一项实时荧光定量PCR检测方法通过扩增16S rRNA的一段157bp片段区域可将冢村菌属与需氧放线菌其他属鉴别开来[196]。

MALDI-TOF MS也可初步将需氧放线菌鉴定至属水平,前提是该菌属成员菌株纳入其数据库中(见下文)。

(六)种的归类

鉴于需氧放线菌菌种数量不断增加,运用表型或者生化试验已不可能获得确切的种水平甚至属水平的鉴定。此外,由于环境和操作程序的变化,表型属性可能不稳定。诺卡菌属中,大多数菌种对绝大部分商品化生化试剂无反应,采用这些方法将妨碍菌株的最终鉴定。对于没有分子检测能力的实验室而言,应当尝试进行属水平鉴定划分。要对有重要意义的患者分离株进行精确鉴定时,通常需要分子检测方法。

生化试验:由于已描述的菌种数量越来越多以及商品化表型试验区分能力低且数量少,生化试验不推荐用于需氧放线菌的最终鉴定。

(七)细胞壁和细胞膜分析

需氧放线菌细胞壁化学分析有助于菌株属水平鉴定,且通常用于新菌属的初始描述。通常只有研究或参考实验室才具备这些化学结构分析方法。细胞壁分析不适用于种水平鉴定。有关需氧放线菌细胞壁特性的信息,请参阅本手册早期版本[197]。

(八)分子鉴定

分子技术,尤其是基因测序,是目前为大多数需氧放线菌分离株提供最终鉴定的唯一方法,分子方法的另一优点是比生化试验节省鉴定时间,而且推动着需氧放线菌各属新菌种的鉴定。

1. PCR扩增检测 使用属、种特异性引物进行PCR扩增,对扩增产物进行凝胶电泳检测能鉴定具有独特基因区域的需氧放线菌。16S rRNA基因区域作为靶标已用于诺卡菌[195]、假诺卡菌和糖多胞菌[198]、戈登菌[199]及拟诺卡菌[200]属水平鉴定。16S rRNA和*choE*基因的PCR扩增及扩增产物检测也已用于红球菌种水平鉴定[201-202]。

Wehrhahn等描述了毛细管凝胶电泳在评估16S~23S基因间隔区作为扩增区域用于诺卡菌菌种鉴定中的应用,对比分析电泳谱图以获取各种大小扩增片段峰的存在与否及其模式特征,发现研究所用的模式菌株显示独特的峰模式,但同时也观察到明显的种内异质性[203]。这种方法用于鉴定未知临床分离株的有效性仍有待证实。

2. PCR-限制性核酸内切酶分析 PCR-限制性核酸内切酶分析(restriction endonuclease analysis,REA)已经应用于常规分离的诺卡菌菌种鉴定,且也用于对16S rRNA和*hsp65*基因的评估[204-205]。该方法利用了微生物基因序列可变区域内存在限制性内切酶识别位点的特点[205]。然而,由于已识别的诺卡菌菌种数量不断增加,且REA方法仅能检测相对短的限制性内切酶识别序列的改变,该技术只能用于少数几个种的鉴定。关于REA鉴定诺卡菌属的技术信息可参见本手册第11版[206]。

除了用于诺卡菌菌种的鉴定,REA也会用于许多需氧放线菌属的鉴别及嗜热放线菌(thermophilic actinomycetes)某些种的鉴定[171,207]。随着放线菌各属内识别的菌种数量的增加,这些方法的使用很可能会受到限制。

3. 基因测序 目前,基因测序已经成为鉴定这群复杂微生物分离株的强有力的且必需的工具,16S rRNA基因序列分析已用于需氧放线菌几乎所有属成员的种水平鉴定[46,51,60,92,144,151,161,168,172]。冢村菌属菌种的16S rRNA基因序列存在少量的异质性区域,因此,该菌属的序列分析不能完全区分该属的菌种[165]。

研究显示，几个基因可以完全区分诺卡菌各个种。到目前为止，诺卡菌属各种的 16S rRNA 基因序列中大多数序列信息是可用的，关于该基因系统发生属性讨论见第 7 章。位于 16S rRNA 基因近 5′末端可变序列区域的存在[205]，使得对该基因一个 500 bp 区域进行部分测序成为鉴定许多诺卡菌的有用方法。Cloud 等[208]比较了带扩展数据库的商品化 16S rRNA 基因测序试剂盒、表型鉴定方法和相同基因的一个 999 bp 区域测序 3 种方法的鉴定结果，分属 10 个种的 94 株临床分离株，应用 500 bp 基因测序试剂盒的鉴定结果与表型方法鉴定结果一致性为 72%，与 999 bp 基因测序鉴定结果一致性为 90%。目前，该商品化系统能鉴别较常分离出的诺卡菌菌种，同时也可用于戈登菌、红球菌、链霉菌和冢村菌属水平鉴定[120]。

为区分 16S rRNA 基因 500 bp 区域内具有完全或近乎完全相同序列的某些种如脓肿诺卡菌、关节炎诺卡菌（*Nocardia arthritidis*）和亚洲诺卡菌（*Nocardia asiatica*）、苛养诺卡菌和老兵诺卡菌，以及熊本诺卡菌（*Nocardia higoensis*）和下总诺卡菌（*Nocardia shimofusensis*），必须对该基因一个大于 500 bp 的区域进行测序，上述各菌种可用 1300 个碱基序列分析得以清晰区分。

通过基因测序鉴定分离株的一个重要方面是用于序列比对的数据库的质量，任何一个序列数据库的用户都应该意识到所用数据库的固有局限性。公共数据库 GenBank（NCBI，美国国家生物技术信息中心）（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）汇集了最广泛的众多基因靶点的序列，缺点是综合数据库的记录未得到有效的组织管理，未知序列和某些低质量记录进行比较可能造成错误鉴定。GenBank 含有一个参考序列（reference sequence，RefSeq）专辑，包含不重复、有注释的序列，并由 NCBI 及其合作者进行有效管理（http://www.ncbi.nl-m.nih.gov/refseq）。GenBank 中被认为能可靠地用于鉴定诺卡菌和其他需氧放线菌的模式菌株序列见表 30-2 和表 30-3。对于没有列入表中的微生物，实验室可能需要获取特定的模式菌株并确定其序列，以此作为患者未知分离株的比对序列。用于鉴定诺卡菌各菌种的 16S rRNA 基因专有数据库可能受限于数据库所代表的菌种数以及每个菌种的序列数量。Cloud 等通过增加序列记录扩展了一个商业数据库，可疑微生物可得到更可靠的匹配结果[208]。其他有用的数据库包括可用于 16S rRNA 基因序列比对的核糖体数据库项目（Ribosomal Database Project，RDP）（http://rdp.cme.msu.edu/）、包含多种靶基因序列的数据库 BiBi（https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi），以及一个包含 16S rRNA 的商业化数据库[209]。

众所周知，由 16S rRNA 基因序列确定的亲缘性相近的诺卡菌种间异质性可能相当小，如有可能，也会使明确鉴定某些菌株变得困难。2 对诺卡菌菌种短链诺卡菌/寡食诺卡菌和克鲁切克诺卡菌/老兵诺卡菌分别显示 99.5%（1352 bp）和 99.8%（1379 bp）的 16S rRNA 基因序列相似性[83,111]，砖色诺卡菌和赭黄色诺卡菌 16S rRNA 基因序列仅有 2 个碱基的差异，研究显示这些菌种对均可通过 DNA-DNA 杂交区分。CLSI 文件 MM18-A 指出，需氧放线菌鉴定至种水平要求有大于 99.6%的相似度，且要求不同菌种间的分离度大于 0.4%[210]。此外，对于属水平鉴定，文件推荐 99.0%～99.5%的序列相似度。笔者建议，准确鉴定新诺卡菌复合群某些成员（如克鲁切克诺卡菌和老兵诺卡菌），序列相似度应大于 99.8%[111]。

据报道，诺卡菌某些菌株 16S rRNA 基因存在多拷贝现象[211-212]。在这些研究中，每个菌株微生物存在多达 5 个基因拷贝，某些菌株中不同的拷贝显示不同的碱基序列。从多拷贝菌株得到的序列图谱在特定位置，特别是在基因可变区内显示多个重叠峰，重复试验并不能解决这些多重峰问题，只有克隆或克隆株的序列分析才能让这些区域的基因序列得以明确。如果一个特定基因的各种拷贝不同，就不可能用该基因序列进行未知菌株的鉴定。不幸的是，几个菌种的模式菌株包含 16S rRNA 基因多重拷贝（表 30-3）[212]。在菌种描述之初收录到 GenBank 的序列没有显示 16S rRNA 基因序列中存在有歧义的碱基，因此也没有反映出多重基因拷贝的存在，还不清楚在 GenBank 录入序列前如何解决引起歧义的碱基序列问题。如果将未知菌株的序列和这些模式菌株的序列进行比较，不可能得到令人满意的匹配结果。有几篇文献报道了模式菌株含有多重基因拷贝的菌种的分离鉴别，在这些报道中，有些显示分离株与模式菌株 16S rRNA 基因具有 100%的一致性，但鉴于多个不同拷贝的存在，鉴定结果存疑。

因具备区分亲缘关系相近的诺卡菌菌种的能力，其他的基因靶标也已用于诺卡菌的鉴定检测。Rodríguez-Nava 等评估了 *HSP* 基因一个 441 bp 区域对 44 种诺卡菌的鉴别能力[213]。他们发现，该基因比 16S rRNA 基因拥有更多的可变序列区域，导致更多的种间序列相异性，这种序列异质程度可用于区分某些 16S rRNA 基因测序相似度非常高的菌种。

secA1 基因是一种编码 SecA1 蛋白的管家基因，SecA1 蛋白对于蛋白质通过细菌细胞质膜的输出至关重要[214]。*secA1* 基因一个 468 bp 区域序列分析显示它可以很好地鉴别诺卡菌各菌种[112]，作者对 30 株具有临床意义的模式菌株或参考菌株研究显示，所有菌种均得到清晰区分。此外，推导的氨基酸序列(156 个氨基酸残基)比对显示对所有的模式菌株和参考菌株均有良好区分作用，并消除了基因序列上存在的某些种内微小异质性。40 株受试临床菌株中，38 株的推导氨基酸序列与其所属种的模式菌株氨基酸序列完全一致。Kang 等报道，戈登菌 *gyrB* 基因和*secA1* 基因序列分析比 16S rRNA 基因序列分析可给予更大的种间辨别能力[215]。*secA1* 基因序列也会用来鉴别冢村菌属细菌[216]。

在一项对 120 株诺卡菌菌株(10 株 ATCC 菌株和 110 株临床分离株)的研究中，Kong 等注意到用*secA1* 基因与用 5′末端 606bp 16S rRNA 基因序列对临床菌株的鉴定存在某些不一致，特别是依据 16S rRNA 序列鉴定为新诺卡菌的菌株[217]。作者指出，*secA1* 基因靶标存在高水平的种内多样性，特别是在圣乔治诺卡菌、皮疽诺卡菌、新诺卡菌和老兵诺卡菌中，并指出*secA1* 基因多样性用于流行病学评估可能是个有用的靶点。不过，由于新近描述的菌种在公共数据库中缺少 *secA1* 基因序列数据，因而很难利用该基因鉴定这些菌种。

虽然已注意到某些菌株存在多重拷贝，但对于诺卡菌菌种的鉴定，*gyrB* 基因也可能是一个有用的靶点[218]。*gyrB* 基因编码 DNA 促旋酶(一种Ⅱ型拓扑异构酶)的 β-亚基。在一项对 56 株诺卡菌模式菌株的评估研究中，Takeda 等[219]指出，采用 *gyrB* 基因靶标，在 1200 bp 序列范围内种间差异度为 82.4%～99.9%(2～270 个碱基差异)，而相同种(由 GenBank 条目确定)的 16S rRNA 基因序列种间差异度为 94.4%～100%，表明 *gyrB* 基因测序可区分某些亲缘关系相近的种。采用 *gyrB* 基因创建的系统进化树与用 16S rRNA 基因建立的相似。此外，该基因也可清晰区分诺卡菌与其他有关属微生物。

Carrasco 等报道 *gyrB* 基因和 *rpoB* 基因可表现不同程度的种间和种内微观的异质性，与 16S rRNA 基因分析相比，在鉴定诺卡菌属方面显示出更好的种区分能力[220]。*rpoB* 基因是另一个编码 RNA 聚合酶 β-亚基的管家基因。在一项对 29 株脓肿诺卡菌的研究中，16S rRNA 基因分析显示单一的序列类型，而 *gyrB* 基因和 *rpoB* 基因分别显示 14 和 18 个序列类型，对圣乔治诺卡菌和皮疽诺卡菌菌株的研究获得了类似的结果[220]。使用这些基因也可能提供关于菌株鉴定的有用信息。然而，Tamura 等[218]指出某些诺卡菌菌株可能存在 *rpoB* 基因的多重拷贝，这可能会使序列分析复杂化。

其他各种各样基因的序列分析已被证实有助于需氧放线菌其他菌属的鉴别。关于戈登菌属的鉴别，Kang 等指出，与 16S rRNA 基因或*secA1* 基因分析相比，*gyrB* 基因序列分析展现出更强的鉴别能力[215]。使用 *groEL* 基因(HSP60)鉴定冢村菌属时种内变异度为 91.1%～98.2%，而使用 16S rRNA 基因时相似度为 96.7%～99.9%[221]。

对某些属而言，比如诺卡菌属，一个以上基因序列分析可能有助于临床分离株的清晰鉴定及不常见菌种的识别。Rodríguez-Nava 等[213]指出，同时用 16S rRNA 和 HSP 基因进行联合分析可解决某些诺卡菌菌株鉴定不一致问题。

多位点序列分析(multilocus sequence analysis，MLSA)也可能有助于阐明需氧放线菌其他成员菌的分类学关系。2010 年，McTaggart 等报道 MLSA 在诺卡菌菌种鉴别和系统发生研究方面的作用，并指出多位点序列分析的应用可能很快会超过作为细菌分类"金标准"的 DNA-DNA 杂交[222]。在一项对 36 株模式菌株和参考菌株及 190 株临床菌株的研究中，作者采用串联组合 *gyrB*、16S rRNA 基因、*secA1*、*hsp65* 和 *rpoB* 5 个基因部分序列的方式，创建基于序列的系统发生簇，结果显示，71.3%的临床菌株可与模式菌株聚类在一起，从而鉴定至种水平。作者注意到，用单个基因靶标序列进行评估时，得到的鉴定结果

与用多位点序列分析方法得到的鉴定结果不同。这种差异在用*hsp65*和*rpoB*基因序列作为靶标时特别明显，多基因序列似乎“缓冲”了个体基因序列中有差异的等位基因的影响。此外，比较发现，用4个基因位点（*gyrB*、16S rRNA基因、*secA1*、*hsp65*）或3个基因位点（*gyrB*、16S rRNA、*secA1*）组合方案所得到的结果几乎和用5个位点一样可靠。然而，对于大多数临床实验室来说，这项多位点序列分析方法不仅昂贵而且费时。

4. 其他分子方法 焦磷酸测序可提供DNA靶标短小区域序列信息，并且可利用其他保守基因的可变区域，但其实际应用受限于测序区域短小、从富含G+C微生物得到的结果解读困难以及不易区分亲缘关系较近的种。

Xiao等用分属14个种共135株参考和临床诺卡菌菌株对PCR结合反向线点杂交技术进行了评估，分别将16S rRNA基因的一个区域、16S～23S基因间隔区的一个区域扩增后，用种或群特异性探针板进行杂交。该方法正确鉴定了91.8%的经16S rRNA基因测序验证的临床菌株[223]。

5. 蛋白组学 MALDI-TOF MS越来越多地用于各菌属和菌种细菌分离株的鉴定，特别是临床分离株的鉴定。根据质谱分析产生的微生物蛋白质组谱图，将单个菌株的质谱谱图与数据库所含质谱谱图进行比较从而得到鉴定结果。已进行了许多研究来评定MALDI-TOF MS技术在鉴定需氧放线菌成员菌方面的效能，一般来说，使用该技术获得的鉴定结果与参考方法的结果显示出很好的一致性，且能快速、准确地鉴定诺卡菌属。

可能会影响MALDI-TOF MS分析结果的培养特性，包含培养基和培养时间，已对其作用进行了评估。已发表的研究表明，对于戈登菌属、诺卡菌属、红球菌属和冢村菌属的分离菌，葡萄糖酵母浸膏琼脂(glucose yeast extract agar)上的生长菌落相较于脑心浸出液琼脂(brain heart infusion agar)上的生长菌落能提供更准确的结果[224]，同时也表明检测诺卡菌属的早期培养菌落可减少随培养时间而变化的菌落特性（如色素和气生菌丝的产生）的影响[225]。Pasciak等建议在使用MALDI-TOF MS进行鉴定之前，红球菌属的培养时间为24 h，诺卡菌属和冢村菌属的培养时间为48 h，戈登菌属为72 h[224]。

MALDI-TOF MS技术的一个关注领域包括用于蛋白质提取的方法。需氧放线菌的成员菌属，像分枝杆菌菌属，具有耐破坏的复杂细胞壁，任何破坏细胞壁和提取蛋白质的方法都必须保持蛋白质的疏水性和亲水性[226]。虽然一些研究描述了用完整菌株直接点靶分析的可行性[227]，但有他人已经证实这种直接点靶技术用于其他需氧菌时不能制备用于MALDI-TOF MS分析的需氧放线菌[228-230]。Verroken等描述了一种诺卡菌分离株煮沸30 min的提取方法[231]，然而，也有人提出煮沸过程使蛋白质鉴定复杂化，因为提取的蛋白质中加入了甲酰基团[232]。最近的研究介绍了利用微球和珠子击打或涡旋进行机械破碎细菌体的提取方法，两种方法均包括乙醇提取[228,230]。此外，对于最初未能获得可接受鉴定结果的菌株，可通过重复点靶和再提取来改进鉴定结果[228]。

目前这项技术的一个局限是在商用的MALDI-TOF MS系统中一些数据库不足以准确地识别需氧放线菌的某些成员菌。Verroken等描述了商用MALDI-TOF MS数据库在43株诺卡菌属的临床菌株鉴定中的应用，这些菌株首先经过表型、酶催化试验及16S rRNA基因测序鉴定[231]，作者只能鉴定出28/43(65%)的分离株至属或种水平，15株(35%)鉴定错误。用另外100株菌株的质谱谱图扩充数据库后，属、种水平鉴定正确率提高至95%(41/43)，仅2株鉴定错误。鉴定结果分析表明虽然某些种所含菌株质谱谱图非常多样化，但仍能通过分析算法聚类在一起。Blosser等报道了一项三中心研究，比较了3个蛋白质数据库获得的鉴定结果，以及这些数据库对属于19个菌种或种复合群的150株诺卡菌菌株进行准确鉴定的能力，并与基因测序结果进行了比较。他们的结果表明，当将质谱谱图与3个数据库的组合进行比较时，获得正确鉴定结果的百分率最高，强调了包含特定菌种不同分离株足够范围的质谱谱图的数据库的必要性。在这篇研究中，当使用评分接受标准≥1.7（脓肿诺卡菌、寡食诺卡菌/短链诺卡菌、新诺卡菌、砖色诺卡菌和德兰士瓦诺卡菌复合群）时，MALDI-TOF MS能很好地鉴定诺卡菌分离株至复合群水平，该复合群内菌种的鉴定不够精确。很少有菌株被错误地鉴定，未被鉴定的分离株评分<1.7。

一些其他报道也强调了健全的质谱图数据库

的必要性，以确保包括戈登菌属、红球菌属、链霉菌属及冢村菌属在内的需氧放线菌其他成员菌的准确鉴定[227,229-230,233]。

九、分型系统

在需氧放线菌中，关于各种菌株分型方法学报道多限于对红球菌、冢村菌、诺卡菌各种的研究，用于诺卡菌菌株分型的最佳方法尚未达成一致。缺少重复性和(或)菌株之间缺乏足够大的差异是大多数方法常见的问题。此外，各种方法的解释标准也不明确。

在诺卡菌各菌种中，皮疽诺卡菌最常涉及感染暴发事件。已有几篇关于运用各种不同方法对星形诺卡菌进行菌株分型的报道，但还不清楚分型结果是否反映“星形诺卡菌复合群”各成员菌的株间差异或内在遗传学差异。最近没有关于需氧放线菌的成员菌菌株分型的相关报道；关于已使用的分型方法列表可参阅本手册的先前版本[3]。

十、血清学方法

自1988年起，没有用于诊断由需氧放线菌引起的感染的血清学方法报道。

十一、抗菌药物敏感性

对所有认为可能有临床意义的诺卡菌及其他需氧放线菌分离株均需进行药物敏感性试验(药敏试验)。CLSI发布了分枝杆菌和需氧放线菌药敏试验核准标准修订版[234]和一份列出了当前MIC折点、质控菌株及可接受范围的附加文档[66]。其推荐的诺卡菌和其他需氧放线菌药敏试验方法是微量肉汤稀释法，已有专门用于需氧放线菌各属的商品化药敏鉴定卡，但在本书编写时尚未批准在美国市场使用。CLSI文件对接种物准备、平板接种、孵化培养及结果解读方法进行了概述。诺卡菌药敏试验需培养3～5天后判读结果，且孵育周期与特定受试菌种类有关。推荐用于所有需氧放线菌初始药敏试验的抗菌药物包括阿米卡星、阿莫西林-克拉维酸、头孢曲松、环丙沙星、克拉霉素、亚胺培南、利奈唑胺、米诺环素、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(复方磺胺甲噁唑)和妥布霉素，二次药敏试验可考虑的药物包括头孢吡肟、头孢噻肟和多西环素。CLSI文件列出了用于诺卡菌菌株药敏检测的所有药物的折点和判读标准，同时要求在给医生的药敏报告上应提供MIC及MIC结果解释[66,234]。文件也指出诺卡菌药敏折点也能用于其他需氧放线菌，但报告时应注明其属于推断性的，有待积累更多药物/微生物组合信息[66]。

2012年，诺卡菌微量肉汤稀释法药敏试验多点重复性研究结果发表[235]，6个药敏检测经验水平不同的美国实验室，采用商品化药敏鉴定卡测试并报告了5种经常分离到的诺卡菌药敏结果。结果显示，实验室间重现性与受试抗菌药物有关，头孢曲松、亚胺培南、磺胺甲噁唑、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑和替加环素的药敏试验结果重复性最低，头孢曲松对圣乔治诺卡菌和华莱士诺卡菌的药敏结果存在的问题最多，可能不应报告这些菌种对头孢曲松的药敏结果。为了避免结果重现性的问题，诺卡菌和其他需氧放线菌(即生长较快的菌种)的MIC结果应在48 h内检查生长情况，如果菌株生长足够，MIC结果应该在此时读取[234]。

除了涉及中枢神经系统的感染，磺胺类药物仍旧是治疗许多诺卡菌感染的主要抗菌药物。由于诺卡菌菌株对磺胺类药物长期体外敏感，且长久以来剂量足够时临床效果明显[235-236]，因此，磺胺类药物经常与其他药物联合使用。最近的几份报道称，诺卡菌对磺胺类的耐药性有增加趋势。Ameen等报道，墨西哥19个由诺卡菌感染导致的放线菌性足菌肿患者中有8个用磺胺类药物治疗失败，作者提议磺胺类药物应当仅用于病程相对较短的限制性放线菌病和向内部器官扩散风险低的放线菌性足菌肿患者[237]。2010年Uhde等报道，1995—2004年，提交到美国CDC进行药敏试验的诺卡菌菌株，61%对磺胺甲噁唑耐药，42%对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(复方磺胺甲噁唑)耐药[238]，作者指出测试结果可能不能代表所有美国分离株的耐药现状，因为只有从严重感染患者或治疗失败患者分离到的菌株才提交到CDC进行药敏试验，作者也没有接收到任何可能的抗菌药物预防使用或患者临床结果的信息。Larruskain等于2011年报道，大多数分离自西班牙北部患者的皮疽诺卡菌对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑耐药[239]。与此

相反，来自中国台湾的一个为期 11 年的 138 株诺卡菌菌株耐药检测结果表明，只有 2%的菌株对磺胺类耐药[240]。Brown-Elliott 等回应了 CDC 关于美国磺胺类药物耐药的报道，他们对美国 6 个实验室分离检测的 552 株诺卡菌菌株进行了回顾性分析，发现仅 2% 的菌株对磺胺类耐药[241]，作者认为，耐药性报道增多可能与磺胺类药物肉汤稀释药敏试验判读困难、推荐的诺卡菌质控菌株缺乏以及确保药敏结果正确判读的能力验证计划(proficiency testing programs)缺失有关。有限数据表明，磺胺体外耐药时，体内仍可显效。2012 年发表的多点微量肉汤稀释法药敏研究表明，测试实验室中磺胺类药敏试验结果重现性非常差[235]，在磺胺类对 5 种细菌(测试确定对磺胺类敏感的巴西诺卡菌、圣乔治诺卡菌、皮疽诺卡菌、新星诺卡菌和华莱士诺卡菌每种各 1 株)1681 个重复性 MIC 测试结果中，14.6%对磺胺甲噁唑或甲氧苄啶-磺胺甲噁唑耐药。作者指出，既然所有测试实验室接种物制备和检测性能都相似，磺胺类药物重现性差最可能的解释是终点判定困难，其终点定义为与质控孔微生物生长比较，受试菌 80%生长抑制时的稀释度。有趣的是，用同样的菌株，采用纸片扩散法测定的 296 个药敏结果中，只有 1.7%显示对磺胺耐药。作者因此建议，当用微量肉汤稀释法进行磺胺类药敏试验时，可同时用 Gantrisin(磺胺异噁唑)(不是甲氧苄啶-磺胺甲噁唑)纸片扩散法验证 MIC 结果，接种的纸片扩散培养皿也有助于检查接种量[235]。CLSI 文件规定，采用微量肉汤稀释法和纸片扩散法 2 种方法进行磺胺类药敏试验但结果显示不一致的菌株，建议重新试验或提交到参考实验室检测[234]。

2012 年的多中心研究还强调了在诺卡菌微量肉汤稀释试验准备和结果判读中可能碰到的其他困难[235]。准备足够的接种物是一个重要考量方面，诺卡菌菌株易凝聚成块的特性常有碍足量均匀的接种物混悬液的制备，CLSI 建议使用“研磨棒”以制备最少微生物聚集体的浓混悬液[234]。此外，CLSI 推荐使用可使接种物混悬液标准化的浊度计，以提供浓度适当的接种物[234]。然而，即使小心制备接种物，用传统平板涂布技术得到的菌落计数可能不能准确代表接种物中实际的微生物浓度，也不一定能对应准确的 MIC 值[235]。与其他微生物相比，诺卡菌药敏试验终点判定更具技术挑战性，该研究推荐技术人员应熟悉 CLSI 指南中提到的终点判定，特别是对磺胺类药物。改善药敏试验结果的其他推荐包括：对技术人员在接种物和稀释板制备方面进行全面、深入培训，将实际药敏结果与特定菌种预期药敏结果进行比较(如当前 CLSI 文件提到的)，选择适当的质控菌株(文献推荐新诺卡菌 ATCCBAA-2227[235])，以及参与不同实验室能力验证计划。多中心研究还推荐，如果得到的敏感性模式与预期结果不同，应将菌株转至参考实验室进行确证[235]。

在一项对诺卡菌和 12 株其他种类需氧放线菌共 51 株临床分离株的研究中，Lowman 和 Aithma 比较了 E 试验(Etest)和微量肉汤稀释法药敏试验结果，在±1 个倍比稀释梯度范围内，E 试验仅显示 46.2% ～ 81.6% 的基本一致性及 67.5%～100%的分类一致性(译者注：根据原始文献，以药敏试验折点浓度为依据所得到的一致性为分类一致性)，对于非常少见的分离菌株，E 试验会出现重大错误(译者注：根据原文献，重大错误即微量肉汤法耐药而 E 试验敏感)，作者认为对于需氧放线菌药敏试验，E 试验替代微量肉汤稀释法是不可接受的，在试验中要注意接种物制备和结果判读等特殊问题[242]。

除了诺卡菌，文献中关于需氧放线菌药敏试验的信息非常有限。采用商品化药敏鉴定卡，Erol 等研究报道了从患诺卡菌型胎盘炎(nocardioform placentitis)的马体内分离到的拟无枝酸菌属受试菌株的 MIC_{90} 结果[243]。目前对于该属的成员菌尚无标准折点和解释范畴。

迪茨菌属分离株对抗菌药物广泛敏感，目前还没有明确的证据表明通过菌种鉴定可以预测其药物敏感性[54]。

Moser 等采用 CLSI 推荐的操作程序，研究报道 13 株食异戊二烯戈登菌临床分离株对阿米卡星、阿莫西林-克拉维酸、氨苄西林、头孢曲松、环丙沙星、亚胺培南、利奈唑胺和万古霉素敏感，但其中 8 株对磺胺甲噁唑耐药[244]。

对 12 株象牙色克氏菌临床分离株的药物敏感试验结果的评价研究表明，除了对克拉霉素耐药外(MIC≥32 μg/ml)，这些菌株对多种抗菌药物的 MIC 均较低[61]。

对于马红球菌，其感染通常需要抗菌药物联合治疗，可用的药物包括氨基糖苷类、红霉

素、亚胺培南、喹诺酮类、利福平和万古霉素。目前CLSI M24推荐接种常规革兰阳性菌药敏鉴定卡(前提是鉴定卡包括该菌的关键抗菌药物万古霉素和利福平)。可借用金黄色葡萄球菌的利福平和万古霉素的药敏折点,对于其他所有药物,应该借用诺卡菌属的MIC折点。培养24 h后可判读结果,在等待积累更多信息时结果应报告为“推断性的”,利奈唑胺也可能有效[150]。也有一些伴有*rpoB*基因突变的利福平耐药菌株的报道[245]。

褶皱慢反应脂肪酸菌菌株的药敏试验可能需要使用Middlebrook 7H9肉汤培养基,因其在阳离子调节Mueller-Hinton肉汤培养基中生长不充分[246]。采用推荐用于诺卡菌和快速生长的分枝杆菌的药敏折点,Butler等[246]报道褶皱慢反应脂肪酸菌菌株对亚胺培南、利福布汀、磺胺甲噁唑和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑敏感,对阿米卡星、阿莫西林-克拉维酸、头孢曲松、环丙沙星、克拉霉素、利奈唑胺、米诺环素和妥布霉素耐药或中介。

一项对92株链霉菌临床分离株的药敏试验研究发现,100%的测试菌株对阿米卡星和利奈唑胺敏感,77%对米诺环素敏感,67%对亚胺培南敏感,51%对克拉霉素和阿莫西林-克拉维酸敏感[247]。

Liu等最近报道了采用短时孵育抗菌药物敏感试验系统研究耐酪氨酸冢村菌、泡沫冢村菌和肺冢村菌的药敏试验结果,3种菌均对阿莫西林-克拉维酸、环丙沙星、莫西沙星和利奈唑胺敏感;耐酪氨酸冢村菌和泡沫冢村菌对磺胺甲噁唑敏感,但肺冢村菌对其耐药[165]。当前CLSI文件表明,冢村菌某些种的药敏试验在孵育48 h后判读结果[234]。

借用已确定的诺卡菌属折点,壁威廉姆斯菌分离株的药物敏感性试验表明这些菌对阿莫西林-克拉维酸、头孢噻肟、亚胺培南、环丙沙星、妥布霉素、庆大霉素和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑敏感[169]。

对于除外诺卡菌属的需氧放线菌,CLSI M24文件表明诺卡菌的折点可暂时用于除诺卡菌以外的其他需氧放线菌,且在等待积累更多信息时这些菌的结果应报告为“推断性的”[234]。

十二、结果的评价、解释和报告

需氧放线菌广泛分布于环境中,因此,特别是当一种需氧放线菌在培养基中少量培养分离到而没有在患者标本中直接观察到时,实验室几乎不可能判定菌株究竟是来自标本还是实验室污染,是患者定植菌抑或是真正感染。对于任何一株需氧放线菌,应报告其数量指标;临床医生和实验室人员之间的讨论对于再次培养时患者标本的选取,以及确定具有临床意义的菌株的实验室处理程序非常有用(已知可引起人类疾病的菌种信息见本章临床意义部分;已知具有临床意义菌种的分离频度信息见表30-2和表30-3)。将微生物鉴定至属水平可能有助于确定其意义。然而,即使是属水平的准确划分,也可能需要采用分子方法,某些情况下,属水平的鉴定(如果可能)足够满足临床诊断、治疗需要。

报告菌株种水平鉴定结果时,应标示菌株是如何鉴定的,且实验室应确保临床医生知道所用鉴定方法的可靠性。用表型方法初步鉴定常见的需氧放线菌,特别是诺卡菌至种水平是可能的,但采用这种方式,某些菌株不可避免地会被错误鉴定。精确鉴定只能采用基因测序获得,如果鉴定结果是通过其他方法获得的,报告应注明鉴定结果是推断性的。对于考虑存在临床意义的菌株,应当报告药敏结果。如果需要得到精确的鉴定和药敏试验结果,可能必须将菌株转到有专门从事此类微生物鉴定专家的实验室。

对于诺卡菌属,分离株可能会鉴定和报告为“复合群”和“群组”水平。基于用于分类的特征方法,这些鉴定方法可能聚类菌种。基于诺卡菌的各种特性,如抗菌药物敏感性模式、各种基因序列以及MALDI-TOF MS质谱图,诺卡菌属已经归类为复合群(见上文)。当实验室报告诺卡菌临床分离株的结果为复合群和群组水平时,重要的是报告要明确描述复合群鉴定的基础,并指明该复合群或群组中被认为包含的菌。

对于敏感性测试,许多菌种根据预测的抗菌药物敏感性模式被分组为复合群。基于敏感性试验结果,诺卡菌属细菌可被分为如下复合群:新诺卡菌复合群、德兰士瓦诺卡菌复合群和短链诺卡菌/寡食诺卡菌复合群[234]。

根据在某菌种成员菌间观察到的基因序列的变异性,诺卡菌分离株可能聚集成一个单一的菌种复合群。Patel等观察到来自一组豚鼠耳炎诺卡菌的65 kDa HSP基因和16S rRNA基因序列

的变异，并指出该菌种实际上可能包含在一个菌种密切相关的分离株复合群[120]。同样，Schlaberg等观察到归属于圣乔治诺卡菌的分离株的 *HSP* 基因和 16S rRNA 基因的异质性[94]。使用各种距离矩阵方法分析属于某特定菌种的分离株的 16S rRNA 基因的相关性，结果表明，尽管这些分离株的基因序列存在差异，但该菌种大多数的分离株聚集在“质心”序列周围[209,248]。单一菌种的分离株的异质性促使一些人将某些菌种称为一个菌种复合群，如豚鼠耳炎诺卡菌[62]。诺卡菌属的序列相似性树状体评估表明，有些菌种基于它们相似的基因序列是密切相关的。在某些情况下，基于基因序列相似性的复合群分组与基于抗菌药物敏感模式的分组一致，尤其是对于新诺卡菌复合群、德兰士瓦诺卡菌复合群和短链诺卡菌/寡食诺卡菌复合群[249]。

无论何时实验室分离出一种测序结果显示为极少分离到的需氧放线菌，应仔细评估微生物菌株周围的环境因素，以判断其潜在的临床意义，查阅近期文献确定关于菌株所属种的致病性和抗菌药物敏感性哪些已明确，LPSN 和 PubMed 可能是文献查阅好的途径，罕见或少见菌的报告应当附一个关于其已知临床意义的简短总结。

非常感谢 Yvonne R. Shea 在菌落图片制作方面提供的帮助。

文中观点仅代表作者观点，不应理解为美国卫生和公共服务部(U. S. Department of Health and Human Services)观点。

参考文献请扫二维码查阅

第31章 分枝杆菌的一般特性、实验室检测及染色

ISABELLA MARTIN, GABY E. PFYFFER, NICOLE PARRISH

（公衍文 译；刘家云、刘文恩 审校）

分枝杆菌属（*Mycobacterium*）包括多种重要的致病菌种，其中最重要的是结核分枝杆菌复合群（*Mycobacterium tuberculosis* complex），麻风分枝杆菌（*Mycobacterium leprae*）和溃疡分枝杆菌（*Mycobacterium ulcerans*）。此外，环境中还发现有170多种非结核分枝杆菌（NTM），它们具有不同程度的致病性和毒力。

结核病作为世界上最大的公共卫生挑战之一，现已超过HIV/AIDS，成为由单一传染性病原体导致的全球头号杀手。近期的数学模型评估发现，全球近1/4的人口为结核病隐性感染者[1]。根据世界卫生组织（WHO）全球结核病的最新调查数据，2016年新发结核病例约630万例（高于2015年的610万例），其中1/2以上来自五个国家：印度、印度尼西亚、中国、菲律宾和巴基斯坦。尽管由于人口膨胀，全球范围内新发病例的绝对数量在增加，但发病率仍以每年约2%的速度下降。此外，2016年，有130万HIV阴性患者和37.4万HIV阳性患者死于结核病（比2000年的170万HIV阴性结核病死亡人数有所减少）。耐药性仍然对隐性和活动性结核感染的疗效构成威胁。2016年，新发约60万例利福平（rifampin）耐药的结核病患者，其中49万例为多重耐药[2]。因此，为实现全球消灭结核病的目标，临床微生物实验室发挥着关键性作用。

除了结核分枝杆菌复合群外，已发现的非结核分枝杆菌的数量也日益增加，由其造成人类感染的发病率也越来越高[3]。这些感染通常是缓慢的、渐进的过程，主要侵犯呼吸道，有时局部感染主要累及皮肤和软组织、关节或淋巴结，对NTM进行快速、可靠的鉴定至关重要。总的说来，临床微生物实验室的服务水平和方法的选择应基于所服务的患者人数和可利用的资源。

一、分类和属的特征

分枝杆菌科只有分枝杆菌一个菌属[4]，并与其他含分枝菌酸的放线菌（mycolata）相关。分枝菌酸是由α-烷基，β-羟基脂肪酸组成，其链长以及化学官能团的数量和类型各不相同。分枝杆菌霉菌酸酯是其中最长的一种，其碳原子数通常为70至90（C70～C90）。除慢反应脂肪酸菌属（*Segniliparus*）的霉菌酸酯范围为C58～C100外[5]，其他大多数放线菌（mycolata）的分枝菌酸较短（棒状杆菌属，C22～C36；红球菌属，C34～C54；诺卡菌属，C50～C62；戈登菌属，C54～C66）。同样，除麻风分枝杆菌DNA的G+C含量为55mol%以外，分枝杆菌属物种DNA的G+C摩尔百分比含量在61～71 mol%，其他含分枝菌酸菌属的G+C摩尔百分比也介于此范围之间，如戈登菌属（*Gordonia*）（63～69 mol%），冢村菌属（*Tsukamurella*）（68～74 mol%），诺卡菌属（*Nocardia*）（64～72 mol%），红球菌属（*Rhodococcus*）（63～73 mol%）和慢反应脂肪酸菌属（*Segniliparus*）（68～72 mol%）[6-7]。

分枝杆菌属是需氧、无动力、略弯曲或直杆菌（0.2～0.6μm ×1.0～10μm），可有分枝。关于该菌属能否形成芽胞或“类芽胞”结构存在争议[8-10]。迄今为止，有关海分枝杆菌（*Mycobacterium marinum*）的研究已经证明，真正的内生胞子与具有耐热性是矛盾的[8-9]。此外，一些研究人员认为，与其他形成胞子的生物相比，海分枝杆菌中与胞子形成有关的基因数量有限。另一物种，培养1年的鸟分枝杆菌副结核亚种（*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*）能够产生营养细胞融

合体，并呈现出胞子样特征的形态。该形态耐热，对溶菌酶和蛋白酶K具有抗性，鸟分枝杆菌副结核亚种特异性序列（16S rRNA 和 IS900）呈阳性[10]。某些菌种，如结核分枝杆菌，可以在组织中持留数月至数年不会复制，当机体免疫监视功能减退时，结核分枝杆菌又重新被激活[11]。这种非复制的持留状态已经可以通过体外建模证实，逐渐去除培养环境中的氧气，结核分枝杆菌、牛分枝杆菌（*Mycobacterium bovis*，BCG）和近期的鸟分枝杆菌副结核亚种能够适应厌氧环境[11-13]。该属的其他菌种是否能够适应厌氧环境还有待发现。

菌落形态随种的不同而变化，可分为光滑型或粗糙型，无色素菌落或有色素菌落。有色素菌落通常为黄色、橘黄色或者因胡萝卜素形成罕见的粉红色菌落。某些菌种需要有光才能形成色素（光产色菌），有些菌种在光照或者黑暗环境均能形成色素（暗产色菌）。很少有气生菌丝，如果不用放大镜很难看见，有时有丝状物或菌丝体生长，然而一旦受到轻微干扰，这些菌体很容易变成杆状或球状。

分枝杆菌细胞壁肽聚糖含有内消旋二氨基庚二酸（meso-diaminopimelic acid）、丙氨酸、谷氨酸、葡糖胺、胞壁酸、阿拉伯糖和半乳糖。分枝菌酸和插入霉菌酸酯层外部的游离脂质（如海藻糖二霉菌酸酯 trehalose-6,6′-dimycolate），共同形成一道疏水渗透性屏障[14]。其他重要的脂肪酸有蜡质、磷脂、酶固酸和结核菌烯酸。还发现了细胞脂肪酸的多种模式（碳原子数为10～20），其中结核硬脂酸（10-R-甲基十八烷酸）是许多需氧放线菌（aerobic actinomycetes）的独特细胞成分[14]。

分枝杆菌细胞壁中复合脂质含量较高，故常用苯胺染料不易进入，且革兰染色不易快速着色。因此，分枝杆菌需采用特殊的染色程序，某些需要加热（如齐-内染色，Ziehl-Neelsen staining），染色后即使是使用酸性乙醇也不易脱色，这一特性即为抗酸性。然而某些菌种在生长的某个阶段这种抗酸性会部分或者完全丧失，特别是一些生长迅速的菌种。

(一)营养需求和生长特性

和其他细菌相比，大多数分枝杆菌生长缓慢，生长时间从耻垢分枝杆菌（*M. smegmatis*）的6 h（被认为是快速生长的菌种）到结核分枝杆菌的24 h或溃疡分枝杆菌的36 h，两者均为生长缓慢的菌种[15]。通常在理想的培养条件下，稀释后的缓慢生长的分枝杆菌在固体培养基中形成菌落需要7天以上，而快速生长菌7天之内就可以形成菌落。但是，菌量足够多的情况下缓慢生长的分枝杆菌也可在7天内形成菌落；同样，快速生长菌因接种量太少或经抗生素处理，可能需要7天以上才能在培养基上生长。大多数分枝杆菌很容易适应相对简单的生长底物，在普通培养基上能够生长，在有矿物盐的情况下，以氨或氨基酸作为氮源，以甘油为碳源。小部分菌种如鸟分枝杆菌副结核亚种、嗜血分枝杆菌（*M. haemophilum*）和日内瓦分枝杆菌（*M. genavense*）生长要求较高，需要补充某些物质，如分枝杆菌生长素、氯化血红素或其他复合物。迄今为止，麻风分枝杆菌尚不能在活细胞外培养。二氧化碳和脂肪酸可以促进分枝杆菌的生长，它们可由蛋清或油酸提供，由于油酸在高浓度（≥1%）时有毒，所以需要加入白蛋白中和其毒性。不同菌种间最适生长温度有很大的差异（30～45℃）。

随着一些分枝杆菌基因组的解析，功能基因组学为研究菌种的生理、代谢调节及相关毒性提供了全新的视角[16]。

(二)对物化因子的敏感性

在避光情况下，分枝杆菌可以在无生命物体上存活数周或数月，例如，结核分枝杆菌复合群在物体表面、土壤或者牛粪便中可以存活数月，并可以感染其他动物[17]。已证明，鸟分枝杆菌副结核亚种（*M. avium* subspecies *paratuberculosis*）不能被巴氏消毒灭活，导致市售的牛奶和其他乳制品中存在活菌[18]。分枝杆菌耐冷冻或干燥，但是高温[如60℃，4 min可以杀死90%的鸟分枝杆菌，但是对于蟾蜍分枝杆菌（*M. xenopi*），则需要33 min]和紫外线（阳光）可以将其杀死[如非结核分枝杆菌对紫外线照射的抵抗力是大肠埃希菌（*Escherichia coli*）的2～10倍][19]。分枝杆菌对酸碱和一些化学消毒剂的抵抗力较大部分其他无芽胞细菌强，季铵类化合物、六氯酚和氯己定均为最好的抑菌剂。在结核病实验室推荐使用的专用消毒剂是含酚类、氯或乙醇[20-22]。其他常用剂，如环氧乙烷、甲醛蒸汽、2%的碱性戊二醛、2%过氧乙酸和稳定的过氧化氢等消毒剂，也能有效杀死

结核分枝杆菌。对于含碘消毒剂，杀菌效果取决于有效碘的含量及有机物质的影响。根据美国疾病预防控制中心（CDC）和美国国家卫生研究院（NIH）的指南，推荐使用中等级别的消毒剂[21]（第 14 章）。

二、流行病学和传播特征

分枝杆菌属包括专性致病菌、条件致病菌和寄生菌。麻风分枝杆菌和结核分枝杆菌复合群在无生命环境中不能繁殖，最适合栖息于人类和温血动物。

当肺结核患者咳嗽时，结核分枝杆菌可存在于患者咳出到空气中的颗粒（飞沫）中，颗粒大小 1～5 μm，在空气中悬浮可达数小时[23]。当易感人群吸入带菌飞沫时可引起感染。研究发现，结核分枝杆菌的感染性可在环境中物体表面或者动物粪便中保持数月之久[17]。低剂量的结核分枝杆菌即可感染人类（50% 的感染剂量（ID50）<10AFB(抗酸杆菌)。基于其传播和感染特性，患者或标本中结核分枝杆菌的医院内传播是医务工作者和实验室人员关心的主要问题之一。疑似或确诊结核病患者的标本应视为具有潜在传染性，并采取适当的预防措施[21-22]。

相比之下，非结核分枝杆菌的生存限制较少，通常在水和土壤中均能生存[19]。然而一些能引起人类疾病的非结核分枝杆菌如嗜血分枝杆菌、苏氏分枝杆菌（*M. szulgai*），它们的生存环境还不明确[24]。其他的如鸟分枝杆菌复合群（MAC）、日内瓦分枝杆菌、戈登分枝杆菌（*M. gordonae*）、堪萨斯分枝杆菌（*M. kansasii*）、慢生黄分枝杆菌（*M. lentiflavum*）、猿分枝杆菌（*M. simiae*）、蟾蜍分枝杆菌和一些生长迅速的分枝杆菌［脓肿分枝杆菌（*M. abscessus*）、偶发分枝杆菌（*M. fortuitum*）、产黏液分枝杆菌（*M. mucogenicum*）和龟分枝杆菌（*M. chelonae*）］，则常栖息于自来水、淋浴喷头、制冰机和相关的生物膜[25-28]。2015 年，在瑞士发现了 6 例由奇美拉分枝杆菌（*M. chimaera*）引起的侵入性感染病例，奇美拉分枝杆菌是通常存在于土壤和水中常见的鸟分枝杆菌复合群中的一个独特菌种。以上患者均做了开胸心脏手术，通过使用受污染的体外循环冷热交换器而感染[29]。随后，宾夕法尼亚州的一家医院在心外科手术患者中发现了第二批非结核分枝杆菌（包括奇美拉分枝杆菌）感染患者，这些患者同样因暴露于污染的冷热交换器而感染。调查结果显示，有 1300 名患者存在潜伏感染。其他已知的分枝杆菌培养阳性的标本来源有未完全消毒的支气管镜及其相关设备。

某些非结核分枝杆菌与医院获得性感染和（或）假暴发（pseudo-outbreaks）相关[24]。分离自伪感染源（pseudoinfections）的菌种包括偶发分枝杆菌以及其他非结核分枝杆菌。虽然非结核分枝杆菌不是人或者动物体微生物菌群的组成部分，但是在无临床症状患者的皮肤、上呼吸道、肠道及生殖道中也可能作为“旁观者”分离出来[30]。由于非结核分枝杆菌无处不在，因此其临床意义很重要，但往往难以解释[24]。非结核分枝杆菌主要通过气溶胶感染肺部，迄今尚未报告 NTM 的人与人之间的传播。非结核分枝杆菌感染的其他可能途径包括摄入土壤或水、吸入粉尘及摄入的菌体经胃食管反流误吸[19]。

三、标本的生物安全、运输和采集

（一）实验室安全规程

在流行病学和传播特征部分提到，由于结核病患者有传染的风险，因此进行风险评估和采取适当的生物安全措施至关重要[20-21]。为了控制气溶胶的产生和其他类型的分枝杆菌污染，需要正确使用生物安全柜，配备有安全防护的离心机，以及采用精细的处理技术[22,31]（第 13 章）。

由于结核杆菌的感染剂量低且可以通过气溶胶快速传播，从事结核分枝杆菌复合群的检测实验室工作人员比不从事此项工作的人肺结核发病率高 3 倍，因此，CDC 在其微生物实验室和生物医学实验室的生物安全指南中指出[21]，从事结核分枝杆菌复合群检测工作的实验室人员，进行操作时生物安全级别为 2 级（BSL 2 级）并不理想。BSL 2 级的操作程序要求防护设备和设施只能进行不产生气溶胶的临床标本操作，如制备 AFB 涂片。所有产生气溶胶的操作必须在Ⅱ级生物安全柜下进行。从事结核分枝杆菌复合群培养（鉴定和抗生素敏感性试验）的高风险实验室应当严格使用 BSL 3 级操作并配备防护设施。这些操作要求对实验室进行限制，用定向气流来保持实验室

内负压，并且对负压要进行监测和登记。工作人员应穿戴特殊的实验室工作服，如防水的、一次性工作服和双层手套[21,31]。将来，如果实验室不能提供 BSL 3 级这样严格的生物安全措施，将不允许该实验室进行分枝杆菌培养。

在工作场所中使用的所有呼吸防护装置（呼吸器）均要通过国家职业安全与卫生研究所（NIOSH）的批准[32]。可使用经 NIOSH 认证的有效率为 95%的 N 系列（N-95 口罩）过滤器（不适用于固体或液体油性颗粒）。它们符合 CDC 推荐的用于预防结核分枝杆菌感染的呼吸器的标准。外科口罩不是通过 NIOSH 认证的呼吸器，因此不能作为呼吸防护装置使用。

要根据危险性评估的结果来决定在实验室中是否使用及如何使用呼吸防护装置。由实验室来执行呼吸防护装置使用计划，应该有一个书面的程序，说明何时有必要使用呼吸防护装置以及使用程序：①选择合适的呼吸防护装置；②如何进行适宜性检测；③针对怎样使用、如何进行合适性检测及呼吸防护装置的储存等方面对人员进行培训。

所有涉及标本或培养的工作，如涂片、接种培养基、添加试剂、打开离心管的盖子、超声处理和分子实验均须在生物安全柜内进行。所有疑似有分枝杆菌的标本处理（包括其他微生物标本），除了以浓缩为目的的离心外，其他操作均须在生物安全柜内进行。从生物安全柜中取出标本之前必须先密封才能转运。所有的工作台面，包括实验台面和生物安全柜内表面在工作前后都需用适当的消毒剂进行清洁。有效的消毒剂包括酚衍生物或其他皂酚混合物和 0.05%～0.50% 的次氯酸钠（根据被污染表面的特性调整其浓度）。由于酚类化合物对人体有毒性，所以不再推荐使用 5% 酚作为表面消毒剂。紫外线是表面消毒有效的辅助方法，当工作区域不再使用时，可进行照射消毒。应该使用无气溶胶的安全屏障离心机，以预防发生试管破碎的情况。推荐使用非开放性火焰的电子灼烧灭菌装置，而不是酒精灯等明火。将使用后的接种环、接种针或接种铲送入电子灼烧灭菌装置之前，可浸泡在装有 95%乙醇溶液的磨砂容器中，以达到去除剩余接种物的目的。推荐使用一次性接种环，如需要使用针头，一定要使用永久性连接针头的注射器。应在方便使用的区域配备高压蒸汽灭菌器，最好是放在 BSL-3 的实验室直通的地方，被污染的废弃物在移交处理之前，必须先进行高压消毒。

工作人员应该每年进行结核菌素皮肤试验（TST）或 γ 干扰素释放试验（IGRA），尤其是在实验室有转阳记录时应增加监测次数。结核菌素皮肤试验或 γ 干扰素释放试验阳性的人应进行胸部 X 线检查，对活动性肺结核进行临床评估。必要时要做体格检查。新的转阳患者应提交到员工健康部门和感染控制部门进行流行病学评价。实验室要有书面的处理实验室突发事故的操作程序。在有可能形成气溶胶的实验室事故发生时，工作人员应屏住呼吸，确保生物安全柜处于工作状态，关闭离心机，然后尽快离开房间以保护自己，关闭屋门至少 30 min（时间的长短根据突发事件的类型、危险程度及房间每小时空气的交换量）。佩戴适当的呼吸防护装置，实验室人员可以返回突发事故的现场清理泄漏物。此后，结核菌素皮肤试验或 γ 干扰素释放试验阴性的工作人员应该重新检测并注意监测，最好是前后使用相同的方法。应该建议孕妇和免疫力低下的人不要在分枝杆菌实验室工作。

（二）生物制剂的运输和转运

分枝杆菌被列入运输和转运监管的传染性物质名录。为了确保公众和运输工作人员不暴露于传染性物质，在美国以及其他国家，对生物制剂的运输制定了严格的规定（比如美国邮政总局不再接收结核分枝杆菌培养基），以确保公众和工作人员不被感染。防护措施包括：①严格的包装要求；②包装应标有适当的标识，如“生物危害”及其他标识；③在紧急情况下，关于危险包裹的文件说明很有必要；④为了应对紧急情况，应该对运输工作人员进行培训，使其熟悉内容物的危害性。关于标本运输内部和外部设施的细节已经进行了详细介绍[31]。

读者可参考自己国家的规范性文件。例如美国，更多细节信息可以从多个文件中获得，包括联邦法规（FDR）的各个部分[33-37]，国际民用航空组织（ICAO）出版的《关于危险品安全运输的技术说明》以及由国际航空运输协会（IATA）出版的《危险品条例》[39]。

(三)标本的采集和储存

总则 许多临床标本均可进行分枝杆菌的分离[40-41]。绝大多数标本来自呼吸道，包括痰、气管和支气管抽吸物、支气管肺泡灌洗液。通常所有的痰标本都要进行分枝杆菌涂片和培养，包括类似唾液的标本，这与细菌学常规操作相反。研究证实，唾液标本用于肺结核患者诊断具有临床实用性，这些患者的唾液和痰标本荧光染色的阳性率分别为 76% 和 100%，而培养阳性率更具可比性(唾液 70%；痰 76%)[42]。其他常用的标本类型包括尿、胃液、组织、活检标本和无菌体液，如脑脊液、胸膜腔和心包腔抽吸液。表 31-1 总结了每种标本类型推荐送检的最少体积和特殊注意事项。血液和粪便标本多来自免疫缺陷患者，而对胃肠道结核或怀疑感染肺结核的儿童患者，粪便可能有助于诊断[43-45]。

表 31-1　不同类型标本分枝杆菌检测的实验室注意事项

标本类型	所需标本最少量	注意事项
痰	1 ml(5 ml 为宜)	混合痰标本拒收，因为会增加污染概率[40]。详见参考文献[40]和[98]。当不能获得理想的痰量时，至少需收集 1ml 痰用于检测
呼吸道标本(支气管抽吸物、支气管肺泡灌洗标本、细针抽吸物、肺活检)	尽可能多收集	适用于不能自主咳痰的患者
胃灌洗液	5～10 ml	12 岁以下的患者可选择此种类型标本 如果标本不能在 4h 内处理完毕，用盛有 100 mg 碳酸钠的一次性无菌容器收集标本，可调整 pH 至中性，长期接触酸会破坏分枝杆菌
尿	40 ml	连续 3 天的晨尿(取中段尿)
脑脊液	5 ml	对于儿科患者，少于 5 ml 也可接受
组织(淋巴结、皮肤及其他活检组织)，脓肿内容物、脓液和伤口标本	尽可能多收集	经甲醛处理的标本不能用于涂片及培养 拭子不能用于培养 组织标本一般不能浸入生理盐水或用纱布包裹
血液/骨髓	5～10 ml	使用 Myco/F Lytic 瓶(Becton Dickinson)[99,100]或 BacT/Alert MB 血液培养基(bioMerieux)[101]进行培养
粪便	1 g	通常只适用于免疫功能低下的患者

采集和送检的标本应放在实验室认可的一次性无菌、防漏、无任何固定剂并且有适当标记的容器中。一般情况下，由于分枝杆菌比较稳定，没必要使用运送培养基和防腐剂。小的活检标本(如细针抽吸物)可以放在少量无菌生理盐水中防止标本干燥。标本应无菌采集，尽量避免污染，例如自来水，因为环境中存在的分枝杆菌可能会导致涂片和(或)培养结果假阳性[46]。一般不推荐用棉拭子采集标本。因为分枝杆菌具有疏水性，可吸附在棉拭子上，使转移到固体或肉汤培养基上的分枝杆菌减少。如果标本在 1 h 内不能转运到实验室(除血标本外)，应置 4℃环境冷藏。同样，送达实验室后，在标本处理之前也应 4℃冷藏(关于标本采集的其他信息见第 12 章和第 19 章)。对不适合的临床标本进行分枝杆菌检测浪费物力和财力。标本不被接受(应当告知临床医生)有多种原因，如：①标本送检量太少；②拭子采集(不应该送检拭子，最好用活检标本或抽吸的标本)；③混合的痰或尿标本；④标本容器破损或泄漏；⑤标本采集和处理时间间隔过长(>7 天)[31]。临床工作人员必须经过适当培训，防止送检不合适的标本。

有关标本的收集和保存的更多信息见本书第 19 章。

四、分离及染色程序

由于分枝杆菌通常生长缓慢，需要培养时间较长，因此污染标本中的各种非分枝杆菌会大量生长。对标本适当前处理(如均质化、去污染和浓缩)、选择合适的培养基和培养条件均有助于分枝杆菌的分离[40-41]。标本前处理须在不严重影响分

枝杆菌存活能力的前提下小心进行，尽可能将污染物清除干净。

(一)标本的处理

无菌采集的组织或体液标本通常不需要前处理。只有在怀疑标本有污染时，才进行去污染处理。如果不明确标本是否需要去污染，可以将其冷藏，第二天再进行常规细菌学培养检查，将要进行前处理的标本接种巧克力琼脂平板检查其有无细菌，然后进行分枝杆菌的培养。

1. 常规无菌标本 正常无菌组织样本可以在0.85% 无菌盐水或 0.2% 牛白蛋白液体中研碎，然后直接接种到固体或液体培养基上。因为体液中的分枝杆菌含量一般较少，所以要浓缩样本来增加分枝杆菌的含量，如≥3000 *g* 离心 15 min，将沉淀物接种到培养基上。如果接种到培养基的体液量过少又不能再次获得，可以将其直接接种到液体培养基中。

2. 污染部位的标本 大多数用来做分枝杆菌培养的标本都有杂菌污染。黏蛋白可以包裹分枝杆菌，保护分枝杆菌免受去污剂的破坏。因此，通过使用减少或消除污染菌同时可以使包裹在黏蛋白和细胞中的分枝杆菌得以释放的处理方法，能够从临床标本中最大可能地分离出分枝杆菌。某些液态标本，尤其是痰标本常常需要进行这样的处理。将分枝杆菌浓缩，以提高涂片染色和培养的检出率。

(二)消化和去污染方法

应采用比较柔和的能有效控制污染菌的去污染方法，以最大限度地提高分枝杆菌培养量。严格遵从标本处理规范是保证最大限度分离分枝杆菌的关键。没有一种消化和去污染的方法适用于所有临床标本、所有实验室和所有的情况。检验工作者必须意识到，所使用的各种方法都有其固有的局限性。即使在最佳条件下，目前所有的处理方法对分枝杆菌来说在一定程度上都是有毒害的。

氢氧化钠(NaOH)是最常用的去污剂，也可作为黏液溶解剂。但是应用时要格外小心，因为NaOH 除了可以杀灭污染菌外，在某种程度上对分枝杆菌也有轻度的杀灭作用。碱性越强、温度越高、作用时间越长，则氢氧化钠对分枝杆菌和污染菌的杀灭作用就越强。这种剧烈的去污染方法会杀灭临床标本中 20%～90%的分枝杆菌[31,40-41]。样品的均质化应使用涡流振荡器，必须保证样本不会在混匀时污染瓶盖，为了避免在混匀过程中产生的气溶胶，在振荡后开盖前要至少静置 15 min。所有这些操作均应在Ⅱ级生物安全柜中进行。

最常见的是采用液化剂和净化剂相混合的方法来处理标本。N-乙酰-L-半胱氨酸(NALC)、二硫苏糖醇和几种酶混合可以有效液化痰标本。这些试剂对细菌没有直接的抑制作用；但是与低浓度的氢氧化钠联合使用则可起到标本去污的作用，有助于分枝杆菌的分离。氢氧化钠的浓度取决于污染程度。如果标本污染严重，可以适当增加氢氧化钠的浓度(但不能超过 4%)。NALC-2% NaOH 是最普遍使用的消化去污染方法[31,40-41]，可参见附录。与之相反，用十二烷基硫酸钠(SDS)-NaOH 进行临床标本的前处理不适合结核分枝杆菌生长指示管(MGIT-960；Becton Dickinson)的培养[47]，因为它会影响分枝杆菌的分离并延长 AFB 的平均检测时间。与用 NALC-NaOH 前处理方法相比，使用 C_{18}-羧丙基甜菜碱(carboxypropylbetaine)会显著提高培养和涂片的敏感性。但是污染率却非常高(20.8%)[48]。

肺囊性纤维化患者的呼吸道分泌物中通常含有大量的假单胞菌，可以用 NALC-NaOH 进行前处理，然后在浓缩沉淀物中加入 5%的草酸便可去污染[49]。另外，用氯己定对患者的痰进行前处理，其非结核分枝杆菌培养的阳性率是用 NALC-NaOH 处理的 2 倍多。有趣的是，80%的囊性纤维化患者呼吸道中存在的铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)会影响非结核分枝杆菌的分离[50]。

从偏远地区或需要长时间运输的标本为在不造成细菌过度生长的情况下分离分枝杆菌提出了另一挑战。加入西吡氯铵(cetylpyridinium chloride，CPC，见附录)的标本可用于从远距离的标本采集点往中心实验室运送，运送过程中不会引起污染菌的过度生长，从而有利于分枝杆菌的分离。在偏远地区，除西吡氯铵外，还推荐使用碳酸钠和硼酸钠，可以使结核分枝杆菌存活 5～18 天[51]。在乌干达进行的一次实地研究发现，与标准的 NALC 方法相比，使用异硫氰酸胍(guanidium isothiocyanate)进行样品处理并没有显示出任何

显著的优势[52]。

在缺乏实验室资源进行标本处理和分枝杆菌培养时，其他一些处理方法仅适用于抗酸染色。在这样的条件下，可以用等体积的 5%次氯酸钠溶液（未稀释的家用漂白剂）来进行痰的液化和浓缩，处理 15 min 后离心，用于抗酸染色[40]。因为化学试剂会严重影响 AFB 的生存能力，所以这样处理过的标本不能进行培养。因此，这种处理方法的主要缺陷是需要收集第二份标本进行培养。但是这种方法对于不需要进行培养或不具备生物安全柜的实验室进行快速制备和观察涂片是非常有效的。

在分枝杆菌中使用的许多传统的去污染方法会影响溃疡分枝杆菌的生长。草酸、氢氧化钠和低浓度盐酸对溃疡分枝杆菌的存活能力影响较小[53]。用低浓度的盐酸（最终浓度 0.03 N）[53]或草酸效果较好[54]。多黏菌素 B(polymyxin B)、两性霉素 B（amphotericin B)、萘啶酸（nalidixic acid)、甲氧苄啶（trimethoprim）和阿洛西林(azlocillin)的混合物可以控制二重污染。

常用的消化和去污染方法的详细步骤请参考文献[31,40-41]，并在本章附录有描述。一般来说，样本要加入等体积的消化剂稀释，孵育一段时间后加入中性缓冲液，然后离心得到含有 AFB 的沉淀。可≥3000 g 离心 15 min，然后将沉淀接种到合适的液体和固体培养基上，以实现最佳分离。

无论使用何种方法都必须小心操作，防止患者标本处理过程中产生气溶胶导致实验室交叉污染[31,55]。由于仅靠结核分枝杆菌培养阳性结果即可作为结核病的诊断基础，假阳性结果会对患者的临床治疗、流行病学调查及公共卫生控制措施产生深远的影响。

优化去污染操作步骤　虽然前处理可以达到非常低的污染率（<2%）甚至不污染，但是严格的前处理不仅会杀灭细菌和真菌，同时也会杀灭分枝杆菌。如果经消化和去污染的固体标本污染率超过 2%～5%，液体标本污染率达到 7%～8%，一般被定义为过度污染[56-57]，可认为是使用的去污剂作用较弱或者消化不完全。单独或联合使用以下措施，有助于降低污染率。

(1)小幅度增加处理的碱性强度。注意，>4%的 NaOH 会影响结核杆菌的生存。

(2)除了用非选择性初始培养基外，为了去除细菌和真菌的污染，还可以使用一种含抗生素的选择性培养基。可以考虑用选择性 7H11 琼脂（Mitchison medium）、Mycobactosel 琼脂（BBL Microbiology Systems，Cockeysville，MD）或者改良的 L-J 培养基。从粪便标本中分离 MAC 病原体，最适宜的培养基是 Mitchison 选择性 7H11 琼脂和 Mycobactosel L-J 培养基[58]。

(3)确保标本被完全消化；部分消化的样本可能没有完全去污染。消化一些比较黏稠的标本时，可以增加 NALC 的浓度。

对每批新试剂的去污能力都应进行检测，除了接种分枝杆菌培养基外，实验室可以将 4～6 个去污染的痰标本接种到血平板上，35℃孵育 48 h。有污染菌生长的标本数量应该很少，甚至为零[31,40-41]。

(三)抗酸染色步骤

涂片镜检可以在标本预处理和浓缩前完成，是诊断结核病最快速、廉价的方法。同时，涂片镜检也是确定高传染性患者的一种快速检测方法[59]。目前美国、加拿大和欧洲的建议是连续 3 次涂片镜检来初步诊断结核分枝杆菌感染的患者（至少 1 次标本是晨痰）。一项有关 3 次涂片/患者的大型回顾性研究表明：第一次样本 AFB 涂片阳性可以确认 89%的患者，第二次样本涂片可以确认剩余的 7.8%，第三次样本涂片可以确认最后剩余的 3.2%。这表明采取连续 2 次或多次涂片，以及 Xpert MTB/RIF 检测(Cepheid)代替 1 次或者 2 次涂片，来确定是否停止呼吸隔离的措施是可行的，并且可以减少医疗费用[60]。

普通革兰染色并不适用于分枝杆菌。革兰染色通常看不见分枝杆菌，也可表现为革兰染色阴性或呈“鬼影”，还可出现串珠状的革兰阳性杆菌，特别是快速生长的分枝杆菌[61]。为了增加染料的着色，有必要应用特殊的抗酸染色方法。尽管我们尚未完全了解抗酸染色的特性，但是碳酸可以在高温下增强染料的着色，如齐-内染色法正是采用了这种特殊的染色方法（图 31-1）。分枝杆菌可与芳基甲烷类染料如品红（fuchsin）形成稳定的复合物。细胞壁分枝菌酸在经酸性乙醇或者强酸处理后仍能使菌保持最初染料的颜色。菌体抵抗脱色的特性被称为抗酸性。某些

复染的染色方法可使菌体在镜下更容易识别。Triton 处理离心后的改良齐-内染色法可以增加脑脊液中胞外结核分枝杆菌的检出率及中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞胞内结核分枝杆菌的检出率[62]。

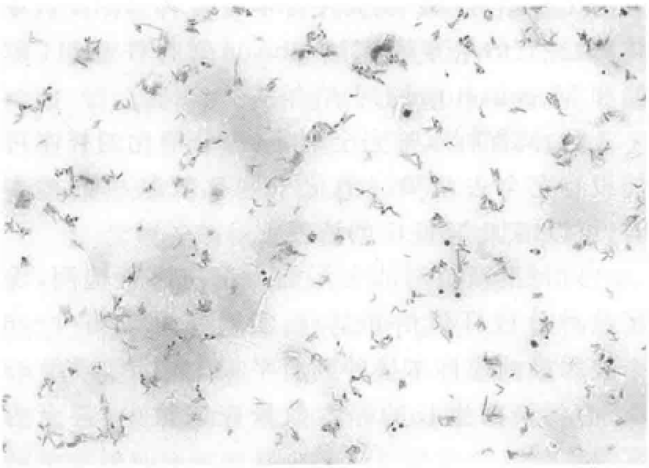


图 31-1 痰中结核分枝杆菌齐-内染色。图像由蔡司成像仪 A2(Zeiss Imager. A2)显微镜拍摄(600×),见彩插

另外,分枝杆菌可进行荧光染色(如单独使用金胺 O 染色或与罗丹明 B 复合物染色)(图 31-2)。与碳酸品红不同,金胺 O 与 DNA 和 RNA 结合后荧光性会增强。荧光显微镜较常规显微镜成本高,但优点更明显,如:①与齐-内染色相比所需镜检时间更短;②涂片不需要加热;③荧光染色并不比碳酸品红染色复杂;④快速(2 min)荧光染色方法,更适于标本量大的实验室[63]。

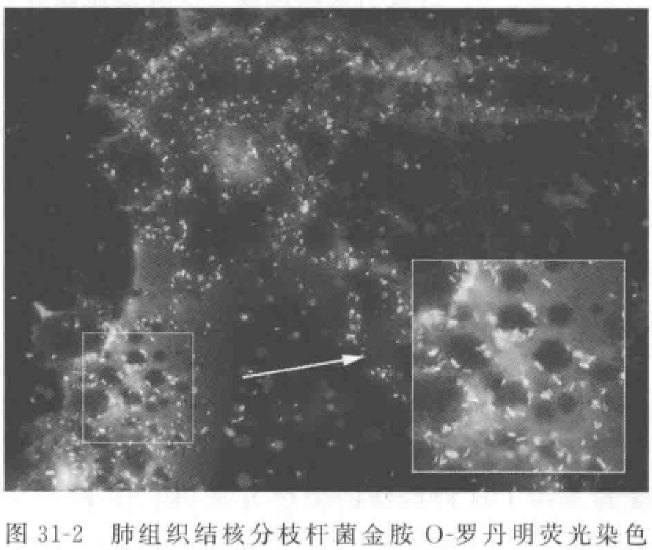


图 31-2 肺组织结核分枝杆菌金胺 O-罗丹明荧光染色(右下特写图像插图)。图像由蔡司成像仪(Zeiss Imager. A2)显微镜拍摄(252×),见彩插

抗酸涂片可能会有假阳性,因此需要非常细致地观察菌体形态。AFB 长 1~10 μm,呈典型的细长杆状,宽 0.2~0.6 μm,可能出现弯曲或弯折。个别菌体的染色可能呈现出重染区和复染区,产生串珠现象。实验室人员必须有充足的训练和经验才可以通过 AFB 形态对分枝杆菌进行推测鉴定。在液体培养基中,结核分枝杆菌通常表现为弯曲杆状,但这种杆状也可见于一些 NTM,如 MAC、戈登分枝杆菌、龟分枝杆菌、脓肿分枝杆菌和海分枝杆菌[64-65]。NTM 可能呈现多形性,如着色均匀的细丝或者球状排列。在痰涂片中出现粗大、交叉的带状形态时,常怀疑有堪萨斯分枝杆菌[66]。小于 10%的快速生长分枝杆菌有抗酸性但不能被荧光素染色[67]。如果怀疑有快速生长的菌体,并且抗酸染色,特别是荧光染色阴性,可以用碳酸品红染色并使用弱脱色步骤进行鉴别。真正的抗酸菌很难被脱色。实验室必须注意,很多非分枝杆菌都有不同程度的抗酸性,例如,红球菌(*Rhodococcus* species)、诺卡菌(*Nocardia* species)、米克戴德军团菌(*Legionella micdadei*)、隐孢子虫属(*Cryptosporidium*)的包囊、等孢子球虫(*Isospora*)、环孢子虫(*Cyclospora*)和微孢子虫属(*Microsporidium spores*)孢子。碳酸品红冷染法似乎没有齐-内染色法和荧光染色法好用[68]。

每一份临床标本涂片都要仔细检查,以确定是否有 AFB 的存在。如果用碳酸品红染片,确认一个涂片为阴性至少要观察 300 个视野(放大倍数,×1000)[31,40-41]。由于荧光染色涂片镜检与碳酸品红相比可在较低的放大倍数下进行(×250),因此在给定的时间内可检查更多的区域。在低倍镜下,至少要观察 30 个视野,每个视野观察时间需用 90 s[69]。用荧光染色法可较容易地检出 AFB,这是一种很好的临床标本检测方法,但对经验不足者而言,带荧光的碎片有时会被误认为杆菌。关于特殊染色的方法见第 20 章和参考文献[31][40]和[41]。

低成本且稳定的发光二极管(LED)显微镜使得荧光显微技术进入低成本设备的行列[70]。WHO 在 2010 年提出,结核病的诊断 LED 荧光显微技术应取代碳酸染色镜检技术。一个对 LED 荧光显微技术和齐-内染色涂片技术进行比较(多国家横断面评估的每个患者 3 张 LED 荧光涂片

对比 3 张齐-内染色涂片)，结果显示 LED 荧光显微技术的敏感性为 77%，齐-内染色涂片敏感性为 70%；LED 荧光显微技术的特异性为 88.1%，而齐-内染色涂片特异性为 96.5%($P<0.001$)[71]。多中心研究分析 11 276 张涂片的结果显示，LED 荧光显微技术的涂片阳性率为 11.2%，齐-内染色的涂片阳性率为 8.6%[72]。值得注意的是，单独使用荧光显微技术时，无论何种存储环境，金胺-罗丹明染色的涂片都会很快褪色[73]。

如果所有的涂片染色均未发现有 AFB 的存在，可报告为阴性结果。如抗酸染色有一张涂片可观察到菌体存在，应报告阳性结果，且应该注明使用的染色方法。最好由其他有经验者复核，确定涂片阳性结果。在理想的情况下，所有的荧光染色阳性涂片都需要碳酸品红染色(如齐-内染色)再次确认并保存备查[31,40-41]。

应该报告涂片中观察到的 AFB 的数目，报告格式见表 31-2[31]。如果在整个片子中只见到 1～2 个菌体，应该记录，但不要报告。为进一步确证，可将同一标本的涂片用其他染色方法进行染色。如果可能，应提供一个新的临床标本进行涂片染色。荧光染色镜检结果应转换成 100× 油镜下的镜检结果。

表 31-2　抗酸涂片评价和报告[a]

报告	下列染色方法在指定放大倍数看到的 AFB 数量及镜检视野数量(扫片数量)[b]		
	品红染色，×1000	荧光染色	
		×250	×450
AFB 数量	0	0	0
不确定；重复试验	1～2,300(3)	1～2,30(1)	1～2,70(1.5)
+	1～9,100(1)	1～9,10	2～18,50(1)
++	1～9,10	1～9	4～36,10
+++	1～9	10～90	4～36
++++	>9	>90	>36

注：[a] 摘自参考文献[40]；[b] 任何时候，一个完整的扫片是指镜检 1 个宽 1 cm、长 2 cm 的涂片的全部

涂片镜检的可靠性不仅取决于实验室工作人员的经验，还取决于标本中 AFB 的数量。当样本中含有 10^6 AFB/ml 时会显示阳性涂片结果，但是如果样本中含有 10^4 AFB/ml，仅有 60% 的涂片为阳性[74]。据报道，直接涂片的总敏感性为 22%～80%[59]。影响敏感性的一个重要因素是实验室获得的最小痰量。一项长期研究显示，大于 5 ml 痰量浓缩涂片的敏感性明显高于不考虑痰量涂片的敏感性[75]。其他影响涂片敏感性的因素包括标本的类型、染色方法、阅片者的经验、被评估的患者数量以及涂片是否经过预处理(间接或直接涂片)等。呼吸道标本的涂片阳性率最高[59]。在实际应用中，即使在较低倍数下观察，荧光染色的敏感性要比碳酸品红染色高大概 10%，这很可能是因为涂片荧光染色的结果更易观察。

由于细胞壁存在分枝菌酸，直接涂片检测分枝杆菌的特异性很高，且属内大多数物种都能观察到抗酸染色特征。理想情况下，仅<1%涂片阳性的标本培养阴性。导致这种情况的可能原因：①标本运送时间延长或标本严重污染导致细菌死亡；②培养时间过短；③细菌生长需要不同温度或生长物质(如溃疡分枝杆菌、海分枝杆菌和嗜血分枝杆菌)。另外，肺结核患者经过一段时间的适当治疗后，可能会出现涂片阳性而培养阴性(平均 2～10 周)。

离心浓缩痰存在显著的生物安全风险，对提高镜检分枝杆菌的敏感性仍存在争议[76-77]。在发展中国家，应用 5% 次氯酸钠液化并离心处理的高浓度痰标本是一种增加涂片敏感性的可行方法。

因为体液标本中分枝杆菌的浓度比呼吸道标本低，对抗酸染色的应用相对较少。现在已有多种技术来浓缩脑脊液及其他体液标本，但缺少比较的资料。离心并不是很有效的浓缩分枝杆菌的方法，因为分枝杆菌的浮力密度接近 1，因此一些菌体会留在上清液中。为此，许多实验室并不对

脑脊液或其他无菌体液进行显微镜检查。

对于每一批新的染色试剂，良好的实验室规范应包括用阳性和阴性涂片进行内部质量评价[31]。可以预先准备含有结核分枝杆菌或NTM的涂片（阳性对照）和革兰阳性菌（最好是不完全抗酸的诺卡菌株）的涂片（阴性对照）。涂片过程中的交叉污染及用水中含有NTM是出现假阳性结果的潜在原因[46]。不能使用染色罐或染色盘。用过的镜油中也可能有AFB。需要制定防止出现假阳性和假阴性结果的问题识别方案[31]。

(四)培养

培养方法的最低检出量为10～100个活菌/ml标本，所以相对于涂片染色来说培养的敏感性更高。分离分枝杆菌的培养基包括非选择性培养基和选择性培养基[31,40-41]。选择性培养基中包含一种或多种抗生素以抑制污染菌及真菌的生长。分枝杆菌初次快速分离时首选肉汤培养基，但即使液体培养基检出结核分枝杆菌时间更早一些，也要选用固体培养基[31]。通常来说，固体培养基能保存6～8周[56]。

1. 固体培养基

(1)以鸡蛋为基础的培养基：以鸡蛋为基础的培养基中含有整个鸡蛋或蛋黄、马铃薯粉、氯化钠和甘油，经浓缩后固化。这种培养基的保存时间较长（如果冰箱冷藏保存，可达数月），大多数分枝杆菌在这种培养基上生长良好。而且还可以中和培养基或接种物中含有的对分枝杆菌有毒性的成分。该培养基的缺点主要包括：每批鸡蛋的质量会影响培养基批间的一致性；很难从残渣中辨别菌落；在抗生素敏感试验中，无法保证稳定的抗生素浓度和准确的试验结果。鸡蛋培养基被污染后可能会液化。

以鸡蛋为基础的培养基中，L-J培养基在临床实验室最常用。在标准抗酸培养基（如L-J培养基）中加入适量的孔雀绿（malachite green）可以抑制杂菌的生长，从而最大限度地分离分枝杆菌。一般来说，L-J培养基分离结核分枝杆菌较好，但对其他分枝杆菌的分离效果不佳。例如，牛分枝杆菌在L-J培养基上生长不佳，但如果将培养基中的甘油替换为丙酮酸，就会促进牛分枝杆菌的生长。与人结核分枝杆菌复合群（*M. tuberculosis complex*）中大多数菌不同，牛分枝杆菌可以在低氧环境下生长。此外，日内瓦分枝杆菌在L-J培养基上不生长，而溃疡分枝杆菌在含有甘油的L-J培养基上生长较好[54,78]。Petragnant培养基中孔雀绿的含量是L-J培养基的2倍，常用于严重污染标本中分枝杆菌的分离。美国特鲁多协会（American Trudeau Society）培养基中孔雀绿的含量较L-J培养基低，选择性较差，因此极易导致污染菌的过度生长。但是由于孔雀绿的含量低，分枝杆菌在美国特鲁多协会培养基上可较早出现较大的菌落。

(2)以琼脂为基础的培养基：相对于含蛋培养基，以琼脂为基础的培养基更容易控制。一般污染菌在以琼脂为基础的培养基上不易生长，但该培养基价格昂贵，保存期短（冰箱保存1个月），而且在制备、培养和储藏时要非常小心，因为过度加热和光照会使之破坏，同时释放出的甲醛对分枝杆菌有毒性。该培养基透明，可发现早期生长的小菌落，很容易和接种的碎片区别。培养10～12天即可对菌落进行观察，而以鸡蛋为基础的培养基需要18～24天。将该培养基翻转过来，即可在10倍或100倍显微镜下观察。使用显微镜从平板底部观察琼脂的表面，可早期发现肉眼看不到的菌落，为分枝杆菌是否存在提供一个早期的推测性鉴定。若用较薄的7H11平板，11天就可以发现微小菌落[79]。以琼脂为基础的培养基还可用于药敏试验[80]。在探索更加经济、快速培养技术的进程中，以菌落为基础的方法已经被开发出来。正如最近的一篇综述所提及，有足够的证据证明这种技术既没有影响生长检测和药敏试验的可行性和费用，也没有对患者的预后产生影响[81]。

Middlebrook培养基含2%的甘油，有助于MAC的生长。其他非抗生素的补充成分也有助于分枝杆菌的分离和培养，例如，加入0.2%的丙酮酸有助于牛分枝杆菌的分离、在7H10琼脂中加入0.25%的天冬酰胺或0.1%天冬氨酸钾可使烟酸的产量增高。在Middlebrook 7H11培养基中加入0.1%酪蛋白降解产物（与7H10唯一的区别），有助于分离对异烟肼耐药（isoniazid-resistant）的结核分枝杆菌。日内瓦分枝杆菌不能在7H11琼脂上生长，而在微需氧条件下，鸟分枝杆菌副结核亚种和日内瓦分枝杆菌可以在添加了分

枝杆菌素 J(Allied Monitor,Fayette,MO)的 Middlebrook 7H11 上生长,或添加血和木炭的酸化 Middlebrook 琼脂上生长[82]。

(3)选择性培养基:在培养基中加入抗生素可有效抑制标本中污染菌的生长。如果将选择性培养基用于临床特殊标本,应与以琼脂或鸡蛋为基础的非选择性培养基联合应用,不能单独使用。以鸡蛋为基础的选择性培养基包括含青霉素和萘啶酸的 L-Gruft 培养基,含环己亚胺、林可霉素和萘啶酸的分枝杆菌 L-J 培养基。Mitchison 选择性 7H11 培养基及其改良型含有羧苄西林(尤其用于抑制假单胞菌)、多黏菌素 B、乳酸甲氧苄啶(trimethoprim lactate)和两性霉素 B。

(4)用于检测嗜血分枝杆菌的含血红素培养基:嗜血分枝杆菌只能在加有氯化血红素、血红蛋白或柠檬酸铁铵的以鸡蛋或琼脂为基础的培养基上才能生长[83]。因此,临床标本应接种在巧克力琼脂或添加某些物质的培养基上(例如,添加有裂解羊红细胞和血红蛋白的 Middlebrook 7H10 琼脂,含Ⅹ因子的平板或含有 1%柠檬酸铁铵的 L-J 培养基),这将有助于提高分枝杆菌检出率。使用肉汤培养基也需加入上述物质。嗜血分枝杆菌也可以用 MGIT 分离培养[84],但是 MB/BacT Alert 3D 系统对检出该菌效果欠佳[85]。总之,由于嗜血分枝杆菌需要的孵育温度低(30℃),营养要求特殊,由其所致的感染不易被检出。

2. 液体培养基　肉汤培养基可用于分枝杆菌的初次分离和传代培养。相对于固体培养基而言,液体培养基检测时限更短,阳性率更高。Middlebrook 7H9 和 Dubos 吐温白蛋白肉汤一般用于分枝杆菌保存菌株的传代,以及为抗生素敏感试验和其他体外试验制备接种物。7H9 肉汤可作为多种鉴定试验的基础培养基。吐温 80 作为表面活性剂添加到液体培养基,使集聚在一起的分枝杆菌分散开来,有助于其均匀生长。

目前,市售的分枝杆菌培养系统种类多样,从简单的管状系统如 MGIT(Becton Dickinson Microbiology System)到全自动系统[如 Bactec MGIT 960 系统(Becton Dickinson)和 Versa TREK Ⅱ型培养系统(Trek Diagnostic Systems,Cleveland,OH),以及 MB/BacT Alert 3D 系统(bioMérieux)]。多项研究已经将这些非放射性技术与那些长期被认为是"金标准"但未商品化的固体培养基和放射性 BACTEC 460 技术进行了对比。

(1)分枝杆菌生长指示管(MGIT):分枝杆菌生长指示管(Becton Dickinson)使用改良的 Middlebrook 7H9 肉汤。基于荧光淬灭的氧气传感器(浸有五水合钌的硅胶)监测分枝杆菌生长。培养初期,大量氧气的存在会导致钌复合物的荧光淬灭,随着肉汤中分枝杆菌和其他微生物的生长,氧气逐渐耗尽,指示管中的荧光强度会增强,可用 365 nm 波长的紫外灯观察。对于手动版,伍德灯或透照仪可以作为紫外灯光源,而 MGIT 960 自动培养系统(见下文)可以连续监测培养管中细菌生长情况。使用前,在 Middlebrook 7H9 肉汤中加入右旋糖酐酸性蛋白亚油酸促进分枝杆菌的生长,同时加入多黏菌素 B、两性霉素 B、萘啶酸、甲氧苄啶、阿洛西林(PANTA)抑制杂菌生长。

总之,MGIT 系统的敏感性和检出时间与 Bactec460 系统相似,在临床评价中要优于固体培养基[86]。但 MGIT 系统的杂菌污染率要高于 Bactec460TB 系统,可能是由于在 MGIT 肉汤中加入一些增菌物质后,能同时促进分枝杆菌与污染菌的生长。MGIT 系统的荧光能够被血和全血标本掩盖。另外,缺少与其他消化和去除污染方法的比较资料[86]。

(2)自动连续监测系统:为监测分枝杆菌的生长,已研制出几种自动化的连续监测系统,如 Bactec MGIT 960(Becton Dickinson)、VersaTREK 培养系统(VersaTREK 诊断系统)和 MB/BacT Alert 3D(bioMérieux)。MGIT 系统使用荧光淬灭氧气传感器检测分枝杆菌的生长。VersaTREK 培养系统利用微生物在生长繁殖时,在消耗养分的同时会产生气体,造成肉汤培养基上方压力的改变,通过监测气体的压力变化,测定微生物的繁殖。MB/BacT Alert 3D 则通过每个瓶子中的二氧化碳比色传感器来监测分枝杆菌的生长。这些系统都包含相同的 7H9 肉汤,其中加入了一些生长因子和抗菌药物。美国 FDA 认可这 3 个系统都可用于分离分枝杆菌。VersaTREK 培养系统和 Bactec MGIT960 系统还可用于结核分枝杆菌复合群的一线药物[异烟肼,利福平,乙胺丁醇(ethambutol)和吡嗪酰胺(pyrazinamide)]的药敏试验。

这些系统性能和操作相似，在临床评价中，Bactec MGIT 960[87]，VersaTREK 培养系统（以前叫作 ESP 培养系统 Ⅱ）[88]，MB/BacT Alert 3D[85,87] 这些液体培养基的检出率优于传统的固体培养基。10 项研究的 meta 分析包含了从 14 745 个临床标本中分离的 1381 株菌株，Bactec MGIT 960 系统检出分枝杆菌的敏感性和特异性分别为 81.5%和 99.6%。Parrish 等[89]指出在检测结核分枝杆菌复合群方面，Bactec MGIT 960 系统比 MB BacT/Alert 系统缩短了检测时间（分别为 13.5 天和 25.2 天），提高了敏感性（分别为 100%和 66.6%）。对于血液标本，BacT/Alert MB 系统、manual Myco/F Lytic medium 和 Isolator 10 裂解-离心系统结核分枝杆菌的检出时间分别为 16.4 天、20 天和 23.8 天[90]。

这些自动连续监测系统有很多优点，诸如没有潜在的交叉污染、工作量减少、可连续监测、保证安全性及可提供电子数据管理系统。由于这些系统是连续监测，培养管/瓶的培养全过程都是在实验室的仪器上，因此这就需要仪器和大量空间的支持。一些自动化系统缺少多功能性，不能直接接种血标本，因此需要其他系统如 Bactec 9050 系统配有 BactecMyco/F 裂解培养基来满足这个需求；或者将血液培养瓶放入 Bactec 9240 或者 FX 中培养。同样采用较低的孵育温度也适用于某些分枝杆菌的培养，如龟分枝杆菌、嗜血分枝杆菌、海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌。Bactec MGIT 960 系统和 VersaTREK 系统（以前的 ESP 培养系统 Ⅱ[80]；详见第 78 章）也可用于一线和二线抗结核杆菌药物的药敏试验（FDA 没有批准）。

任何时候采用自动连续监测系统，均有可能检测不到分枝杆菌的生长。Pena 等[91]的研究也证实，13%（1323/10 263）的标本分枝杆菌培养阳性，其中近 1%仪器培养阴性，但培养 8 周后分枝杆菌生长指示管显示分枝杆菌生长，并有肉眼可见的菌落。

3. 培养基选择 可依据工作人员的喜好和（或）实验室的习惯，选择分离分枝杆菌的培养基和培养物检查程序，并以能最快检出和鉴定分枝杆菌分离株为目标对其进行优化。目前可使用的培养基与培养方法非常多，足以使实验室有更多的选择来建立适合本实验室的、针对患者人群需要的检测方法。工作量、资金以及有限的标本量，成为工作中选用各种类型培养基的制约因素。因此，分枝杆菌培养总是采取一些折中方案。

目前，人们普遍认为实验室要更好地分离分枝杆菌，必须使用液体培养基联合至少一种固体培养基进行培养[31]。使用固体培养基有利于培养那些有时不在液体培养基中生长的菌株，能够检测混合分枝杆菌感染。由于肉汤培养基有较高的污染率，因此可以作为备用培养基使用。所有阳性的培养，即使已从肉汤中直接分离鉴定，也必须传代到固体培养基上检测混合感染，根据菌落形态得出正确的鉴定结果。鉴于上述原因，上述自动连续监测系统不能作为分枝杆菌的独立培养系统。

在固体培养基上培养分枝杆菌在许多方面优于肉汤培养，具体体现在固体培养基上的菌落形态有助于鉴定，并方便下一步验证试验的选择。然而，以肉汤为基础的检测系统有时也可以提供镜下形态线索，比如索状结构（见上文），但是这一现象在部分非典型分枝杆菌也可以观察到，因此对结核分枝杆菌的鉴定价值需要慎重评价[64-66]。

4. 孵育

（1）温度：对大多数临床标本而言，最适培养温度为 35～37 ℃。而来自皮肤和软组织的标本可能含有海分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、龟分枝杆菌、嗜血分枝杆菌，这些细菌的最适培养温度较低。对于这些标本，需要再接种一套培养基，放在 25～33 ℃培养。在较低的温度培养时，需要增加培养时间。最新的自动化液体培养系统培养温度不能低于（36±1）℃。

（2）气体：采用传统培养方法对标本进行分枝杆菌的初次分离时，5%～10%的 CO_2 浓度能够刺激分枝杆菌的生长。Middlebrook 琼脂需要 CO_2 刺激培养物的生长，鸡蛋琼脂在最初培养的 7～10 天（即对数生长期）内需要 CO_2。如果 CO_2 培养箱容积有限，可以将 L-J 培养基转移到环境空气培养箱。如果没有 CO_2 培养箱，可以使用含 CO_2 产气药片的密封袋对平板进行培养。烛缸法不能用于分枝杆菌试验，因为其氧含量低于分枝杆菌生长所需。肉汤培养系统通常不需要增加 CO_2 浓度。

（3）时间：固体或者液体培养基培养分枝杆菌一般要持续 6～8 周才能确认分枝杆菌培养结果

为阴性。涂片阳性而培养阴性的标本需要增加 4 周培养时间。同样的处理方法也适用于培养阴性而核酸扩增阳性，或者有持续肺结核症状患者的标本。在接种物完全吸收前平皿应朝上，当接种物完全吸收后，平板应翻转后置于 CO_2 可通透的塑料袋中，或使用 CO_2 可通透的皱封产品密封，或使用纤维蛋白带密封，以防止培养过程中培养基干燥脱水。试管培养基要倾斜放置，在培养的第 1 周盖子要拧松，直到沉淀被吸收，然后如果空间有限，可以将它们直立培养。在随后的 2～3 周，培养基盖要拧紧，以防止培养基脱水。来自皮肤损伤处的标本如怀疑有溃疡分枝杆菌感染，应将其培养时间延长至 8～12 周。

(4)观察结果时间：分枝杆菌较其他微生物生长缓慢，观察的频率要低于常规细菌学检查。在接种后 3～5 天内，需要对所有的固体培养基生长情况进行检查，以早期检测生长迅速的分枝杆菌，也便于及时去除污染的培养物。在培养的前 4 周每周观察 2 次，4 周以后可每周观察 1 次。不透明的培养基可用放大镜观察，用显微镜观察琼脂培养基上的微小菌落，有助于早期发现分枝杆菌。

MGIT 手工检测在最初培养的 1～2 周内可以每天观察分枝杆菌的生长。然后，可以 2 周或 1 周观察一次。

使用某一连续监测系统，当检测标本转为阳性时，系统会自动报警提醒实验室工作人员。系统报警后，需要对培养瓶中的肉汤进行涂片染色来确认是否有菌。此外，将标本接种在羊血或巧克力平板上，以确定是否存在污染。一旦检测到抗酸杆菌生长并经涂片证实，需传代至分枝杆菌特异性培养基(如 Middlebrook 7H11 琼脂)上，以确定是否存在多种分枝杆菌，通过琼脂上的菌落形态帮助鉴定，并为其他检测(如药敏试验)提供纯培养的细菌。

(5)阳性标本的保存：阳性培养物可在室温下放置数周，如果传代培养，可以在室温放置数月。固体培养基需要密封以避免培养基干燥。CLSI[31] 建议将来如果需要随访培养物可冻存于－80 ℃(至少 1 年)或者按照 Shu 等[92]的方法冻存。

五、结核病的免疫诊断试验

隐性结核的免疫诊断试验有很多，包括有百年历史的结核菌素试验(TST)到新上市的全血标本的体外 γ 干扰素释放试验(IGRA)。这些试验方法的特点在第 33 章介绍。

六、交叉污染

随着分子流行病学研究中分子诊断技术的应用，与实验室操作或者罕见的与污染的支气管镜有关的交叉污染能被很容易地证实。在标本收集到结果判读的任何一个步骤都可能会出现假阳性结果[31,93]。实验室工作人员应该警惕可能出现的实验室错误：①培养结果与临床情况不相符；②缓慢生长的培养物(固体培养基上菌落数＜10 个克隆)或者在液体培养基上缓慢生长的分枝杆菌；③有大量的培养物是实验室少见的菌种，或认为是环境污染菌；④某个患者提交的多个标本中只有一种培养阳性。有许多因素可能会导致假阳性的结果，如器械或设备灭菌不彻底(如支气管镜)，使用被污染的水来收集标本或进行实验室操作，通过直接接触或使用普通的试剂或器械来转移标本，弄错被检测样本或盖错标本的盖子，没有注意将气溶胶的产生降到最低等。以下将详细讨论实验室的交叉污染问题。

七、质量保证

1. 概述　质量控制(QC)是监测一个实验室检测和分离分枝杆菌有效性的关键。它包括标准实验室质量控制组成，实验室质量保证的标准组成部分，例如，人员能力、程序文件、外部能力验证(PT)和质控物、方法、试剂等的室内质控(QC)等(第 19 章和第 20 章)。进行分枝杆菌检测的实验室应遵循相关科学文献和专门出版物的质量控制建议[31,41,80]。

公共卫生服务部(the Public Health Service)在 1967 年引入了分枝杆菌实验室“服务水平概念”。在这个框架下，实验室决定着服务的水平，该服务水平应该表现在：可最好地服务于患者人群的需要、工作人员经验、实验室设备及他们获得样本的数目，同时时刻牢记生物安全风险。服务水平是由疾病预防控制中心基于工作量、个人的经验和成本效益，由美国胸科协会 ATS 和美国病

理学家协会(CAP)颁布[94]。在临床分枝杆菌实验室工作的试验人员必须受过良好的训练,并持有对这些特殊试验技能的认证。在美国,所有执行分枝杆菌检测的实验室必须登记参加联邦和国家监管机构认可的外部能力验证。Ⅰ级实验室(抗酸涂片)每周必须处理至少15例样本,Ⅱ级实验室(涂片、培养、鉴定和结核分枝杆菌复合群的药敏试验)每周必须处理至少15例样本。Ⅲ级实验室除进行Ⅱ级实验室的所有活动,还需鉴定所有非结核分枝杆菌(如有必要还需进行药敏试验)。

最近颁布的CLSI标准描述了按照质量保证的指导方针需要监控的多个检测指标[31,80]。可接受的质控参考菌株的检测结果并不代表能保证所有临床分离检测结果的准确。如果临床分离菌株出现不一致的结果,应重复检测以尽可能确保准确性[93]。每个实验室应具备行之有效的政策来验证非典型试验结果。

实验室必须储备一定量有明确特征的分枝杆菌菌株以维持质量控制系统。这些质控菌株可从美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得,并要熟练掌握检测程序。如果这些菌株每月进行传代的话,可将它们保存在L-J斜面或7H9肉汤中,37 ℃或室温下保存。如果在4 ℃下保存,L-J斜面可保存长达1年。耐药菌株不推荐这种保存方法。长期保存最好将菌株悬浮于水、盐水或7H9肉汤中,(−80±10)℃冷冻保存[31]。

2. 涂片、培养和分子检测的质量控制 除了外部的质控测试,实验室应该尽一切努力进行内部质量控制。例如,每一新批次商品化或实验室内部制备的培养基的质量控制。参考文献[31]和[41]概述了实验室用于监测临床分枝杆菌许多不同工作步骤的详细操作规程。

理想情况下,阳性对照涂片应来自患有活动性肺结核患者的浓缩痰样品。实际上,许多实验室使用储存菌株的菌悬液,或将其接种到阴性痰标本上作为抗酸染色程序的阳性质控对照。质控涂片可通过商业途径获得(BBL AFB QC玻片;Becton, Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD)。如果涂片阳性但培养阴性的比例增加超过2%且不能归因于抗分枝杆菌治疗或有抗酸杆菌(AFB)存在,则提示所使用的水或试剂在预处理或染色过程中被非结核分枝杆菌污染。戈登分枝杆菌、土地分枝杆菌复合群(*M. terrae* complex)或偶发分枝杆菌最有可能与此相关。抗酸染色涂片的敏感性与离心过程中的相对离心力(RCF)直接相关。因此,实验室应计算其离心机的离心力并定期监测和记录,通过转速计检查每分钟转速,监测是否到达足够的离心力[40]。

实验室还应监测已净化标本的污染率(在培养基上产生污染的样本比例)。固体和肉汤培养基可接受的污染率前文已描述过。污染率低于2%,通常认为去污染过程过于严格,应进行修改,以尽量减少对分枝杆菌的杀灭作用。污染率在固体培养基中高于5%,在肉汤培养基中高于8%通常认为去污染过程不彻底,杂菌的过度生长可抑制分枝杆菌的培养。应该注意的是,液体培养基的广泛使用增加了气溶胶的产生,因此,样品间污染的风险也增加。实验室处理大量的MAC、脓肿分枝杆菌或来自囊性纤维化患者标本时,由于痰中有很高的革兰阴性菌定植率,特别是铜绿假单胞菌,可能会导致较高的污染率。

由于分枝杆菌的培养涉及多个步骤,在实验室环境中,分枝杆菌存活时间较长、某些样本中分枝杆菌数目较大,都会使分枝杆菌的培养出现差错[55]。培养结果假阳性的原因可能有:贴错标签、样品处理时的互换、标本残留(包括能力验证标本)、试剂污染及培养管或培养瓶之间的交叉污染[31,55]。在患者标本的处理过程中由于阳性对照(如结核分枝杆菌的悬浮液)存在交叉污染的风险会降低结果可信度。标准的实验室操作有助于最大限度地减少假阳性的出现,此外,还应建立快速识别假阳性结果的机制。培养物的转移或接种必须使用单独的移液管、独立包装的稀释管或一次性实验室器具来完成。应记录样本处理及接种顺序。阴性对照与来自患者的样本进行相同消化与去污染处理,可以检测到在试验过程中可能的交叉污染,或者可以用处理溶液直接培养。实验室应前瞻性地追踪阳性率。分离的重要性可以通过查看该标本的所有操作处理的程序(如初步处理、液体培养基读数、传代培养)、直接涂片结果、阳性时间及临床病史来确定。由于引进了结核分枝杆菌菌株的分子指纹,已证明培养假阳性出现的频率比以前更高。在一个超过100例患者的假阳性培养率的研究中,认为中位假阳性率为3.1%。值得注意的是,236例培养假阳性的患者中有67%接受了不必要的住院治疗[55]。如果能建立一种快

速分子指纹识别的方法，可以及时证明假阳性，就能将这些不良事件的有害影响降到最低。没有结核病临床症状患者的标本，如果仅结核分枝杆菌培养阳性而 AFB 涂片阴性时，应该采用 PCR 分型技术来排除实验室污染[31]。1 周时间内从不同患者中分离出相同指纹的菌株，应考虑可能是假阳性。

美国 CDC 和其他机构[31]建议 AFB 涂片自收到样本 24 h 内报告阳性结果。实验室接收标本和结果报告之间的周转时间应作为实验室质量控制的一部分加以监测。自收到样本后，分枝杆菌的鉴定和药敏性试验的报告时间分别为 14～21 天和 15～30 天[95]。

基于核酸扩增(NAA)的分析方法除了有阳性和阴性对照外，还应有多级控制水平(如检测扩增的抑制及标本之间的污染)[96]。作为 FDA 确认的方法，用于结核分枝杆菌诊断的 NAA 试验并不能替代以前推荐的方法[97]。使用实验室自己开发的方法或商业化的未得到批准或超说明使用的 NAA 试验对患者样本进行实验室检测和报告结果，在其应用于诊断之前，必须确认该方法的有效性，并建立自己有效的操作流程。作为确认的用于临床微生物学的 NAA 分子生物学诊断方法，其发展、有效性、质量保证和常规应用可详见 CLSI 的相关内容[96]。然而，并不推荐基于唯一的 NAA 试验阳性结果鉴定结核分枝杆菌，因为这些方法的结果变异性很大。

扩增的评估应该包括阳性和阴性质控，以及检测抑制剂的质控，如内源核酸的存在。其他的质量控制措施包括所涉及的限制性内切酶、试剂、设备的检查和实验室设计(即用于样品处理、扩增和检测的区域要分开)的分析评估[96]。目前，在美国和欧洲已有良好的能力验证计划用以评估实验室核酸扩增试验能力。

八、小结

维持先进分枝杆菌实验室运转的关键是有充足的资金支持和良好的专业培训[31,80,96]。在结核病的诊断和控制方面，实验室起到举足轻重的作用，应加强措施，使分枝杆菌的检测、鉴定和药敏试验方法更加灵敏和快速，同样也适用于其他分枝杆菌菌种的检测。包括：①对分枝杆菌进行荧光染色涂片；②基于肉汤的培养与镜检；③快速鉴定方法(如分子检测)。

AFB 涂片结果要在 24 h 内报告，这对大多数实验室而言是一个挑战。日常样本的处理要实现这个目标，会给实验室增加相当大的预算。

NAA 技术的出现为当天检测和鉴定结核分枝杆菌提供了保障。这种新技术的应用也带来了多种新的挑战。虽然这些新技术对涂片阳性的呼吸道样本效果很好，但它们对菌量少的肺部疾病或肺外疾病诊断提供的信息很少。该新技术已被证明是对培养方法的补充，但不能替代之。获得菌落以进行药敏试验测定，以及检测除结核分枝杆菌以外的其他分枝杆菌仍然需要采用培养法。

来自 NTM 分离物的意义可能较难评价，因为许多菌种是条件致病菌，可以参考由 ATS 提出的标准对其进行评价[24]。此外，对 NTM 的准确鉴定可防止将罕见致病菌误判为非致病菌。

因此，AFB 镜检、分子检测、培养、鉴定和药物敏感试验结果准确、及时报告是临床有效治疗和采取适当的公共卫生措施及控制感染的关键[31]。

九、附录

(注：以下所列的所有有关患者标本或活的分枝杆菌培养物的操作均应在经过认证的生物安全柜中进行。)

常用的消化-去污染方法[31,40-41]如下。

(一)NALC-NaOH 法

1. 试剂

(1)消化剂：每 100 ml 包含 50 ml 无菌的 0.1 mol/L(2.94%)枸橼酸钠和 50 ml 4% NaOH。NaOH 和枸橼酸钠混合后灭菌，并储存以备用。对于该混合溶液，使用前加入 0.5 g NALC 粉末，在 24 h 内使用，因为 NALC 暴露于空气中特性会降低。

(2)磷酸盐缓冲液：浓度为 0.067 mol/L，pH 6.8。将 50 ml 溶液 A(0.067 mol/L Na_2HPO_4，9.47 g 无水 Na_2HPO_4 溶于 1 L 蒸馏水中)和 50 ml 溶液 B(0.067 mol/L KH_2PO_4，9.07 g KH_2PO_4 溶于 1 L 蒸馏水)混合。如果最后缓冲液需要调整 pH，加溶液 A 调高 pH，加溶液 B 调低 pH。

(3)牛血清白蛋白(可选择)：用无菌的 0.2%

牛血清白蛋白(BSA)Ⅴ部分(pH 6.8)。

2. 操作步骤

(1)将 10 ml 样本置于一无菌的、有刻度的 50 ml 塑料离心管中,做好标记。离心管应防漏,不产生气溶胶,并带螺旋盖。加入等体积的 NALC-NaOH 溶液。离心管中 NaOH 的终浓度是 1%。

(2)将盖子完全拧紧。倒置该离心管,使 NALC-NaOH 溶液与离心管壁和盖充分接触。然后在涡旋器上混匀约 20 s。如果 20 s 不能完全溶解,可在下面的净化过程中摇晃溶液。

(3)该混合液室温静置 15 min,其间可用手轻轻摇晃。为防止样本产生气泡,应避免移动样本。加入少量的 NALC 以使样本更好地溶解,样本与净化剂相互作用应保持 15 min,否则,将导致分枝杆菌分离困难。如果想提高去污染能力,可以稍微增加 NaOH 的浓度。

(4)向离心管中加磷酸盐缓冲液(pH 6.8)至 50 ml。

(5)该溶液以≥3000 *g* 离心至少 15 min。

(6)缓慢弃上清液,上清液收集于防溅的有适量消毒剂的废弃容器里。往废弃容器倒上清时不要触及离心管的盖子。用消毒剂浸湿的纱布(分成小块用于每个离心管)消毒每个离心管的管口,擦拭水滴并且重新盖好盖子。

(7)每个离心管使用一个单独的无菌移液管,向管中沉淀物加入 1~2 ml 无菌 0.2%牛血清清蛋白Ⅴ部分(pH 6.8),或 1~2 ml 磷酸缓冲液(pH 6.8)。并用吸管混匀沉淀物或者用手轻摇离心管。BSA 对于沉淀物有缓冲和去毒的作用,同时增加样本对固体介质的黏附性。然而,BSA 可能延长检测时间(例如,在 BACTEC 460TB 系统)。

(8)将样本接种于适当的固体培养基和肉汤培养基中。每个样本用一个单独的一次性毛细移液管滴加 3 滴样本到固体培养基上。

(9)准备抗酸染色涂片。用一支一次性无菌吸管,吸取 1 滴沉淀物于一张干净、标记好的显微镜载玻片上,点样面积大小约 1 cm×2 cm。将涂片放在 65~75℃电子玻片加热器上进行干燥 2 h,并固定。另一种方法,令玻片在空气中干燥,并将玻片经过火焰的蓝色区 3 或 4 次进行固定(加热固定并不能完全杀死分枝杆菌,载玻片仍有潜在的传染性)。

(10)冷藏剩余的沉淀物(4℃),以备后期使用(例如,假如样本被污染等,用于直接药敏试验或进一步处理)。

NALC-NaOH 方法可以用于处理胃灌洗液、组织、粪便、尿和其他体液。对已中和的胃灌洗液和其他体液(≥10 ml),将其装在无菌螺旋盖的 50 ml 离心管里,以≥3000 *g* 离心 30 min,弃上清液,用 2~5 ml 无菌蒸馏水悬浮沉淀物,其他处理同痰样本。如果胃灌洗液是黏液脓性的,每一份 50 ml 灌洗液加 50 mg NALC 粉末,离心之前涡旋混匀。没有进行无菌操作提取的组织,可将样本研磨,放于一支离心管里,通过匀浆器均匀加工处理,其余的处理同痰样本。对粪便样本,取约 1 g 成形的样本或 1~5 ml 液体样本于 10 ml 的 7H9 肉汤、无菌水或者无菌盐水里,剧烈涡旋振荡 30 s,然后静置 15 min,使大的颗粒沉淀到离心管底部。取 7~8 ml 的上清液放于一个 50 ml 离心管里,其余的处理同痰样本。

(二)NaOH 法

1. 试剂

(1)消化剂:NaOH 溶液(2%~4%),高压灭菌处理。

(2)2 N HCl:用水稀释 33 ml 浓盐酸至 200 ml。高压灭菌处理。

(3)酚红指示剂:20 ml 酚红溶液(4% NaOH 中含 0.4%)和 85 ml 浓 HCl 混匀,加蒸馏水至 1000 ml。

(4)磷酸盐缓冲液:缓冲液是 0.067 mol/L,pH 6.8。参照 NALC-NaOH 方法中制备磷酸盐缓冲液的程序。

2. 操作步骤 按照 NALC-NaOH 方法中描述的程序,可用浓度为 2%的 NaOH 代替 NALC 消化。

(1)取最大体积为 10 ml 的样本于一个无菌 50 ml 塑料螺旋盖离心管中。加入等体积的 NaOH 溶液。

(2)拧紧盖子,倒置离心管,然后在混合器或者涡旋器上剧烈振荡 15 min,再静置 15 min。NaOH 浓度可以增加到 3%~4%,以减少污染率。

(3)向离心管中添加磷酸盐缓冲液(pH 6.8)至 50 ml,盖好盖子,用手涡旋混匀。

(4)以≥3000 *g* 离心样本 15 min,弃上清液,并向沉淀物中加入几滴酚红指示剂。用盐酸中和

沉淀物。彻底混匀管内的物质，当溶液出现的黄色稳定后则停止加 HCl。

(5)用1～2 ml 磷酸盐缓冲液或无菌的0.1%牛血清白蛋白(BSA)Ⅴ部分重悬沉淀物。

(6)将重悬浮沉淀物接种于适当的培养基同时涂片。

(三)油酸法

1. 原理 油酸法优于碱法，因后者处理的样本中常有假单胞菌属和其他细菌的污染。经油酸处理的样本可以用于 Bactec 460TB 系统。当已经处理的沉淀物中有假单胞菌属和其他非发酵革兰阴性杆菌污染时，油酸法可以用来去污染处理。

2. 试剂 5% 油酸，生理盐水(0.85% 氯化钠溶液)，4% NaOH，酚红指示剂或 pH 试纸。

3. 操作步骤

(1)将10 ml 或者不足10 ml 的样本置于50 ml 离心管中，加入等体积的5% 油酸。

(2)涡旋混匀溶液，然后室温静置30 min，其间可偶尔摇晃。

(3)离心管中加无菌盐水至50 ml。将盖子盖紧，并颠倒几次使液体充分混匀。

(4)以≥3000 *g* 离心样本15 min，弃上清液，向沉淀物中加入几滴酚红指示剂，也可以选择 pH 试纸。

(5)用4% NaOH 中和。

(6)将沉淀物悬浮，接种于培养基上，同时涂片。

(四)CPC 方法

西吡氯铵(CPC)是一种季铵复合物，可用于去污染样本，而氯化钠是起液化作用。对于接种到琼脂培养基上的分枝杆菌，CPC 是稳定剂。在消化处理过程中，这种作用并没有被中和。因此，经 CPC 处理的样本沉淀物只能接种于鸡蛋培养基上。这种方法与 Bactec 460TB 不兼容。

这是一种样本消化和净化的过渡方法(大于24 h)。在溶液中分枝杆菌能存活8天。

1. 试剂 CPC 消化-净化剂。将10 g CPC 和20 g 氯化钠溶解于1000 ml 的蒸馏水中。避光防止高热和蒸发，该溶液自身可保持无菌。微温的工作液可防止结晶的出现，在处理中所用的其他试剂包括无菌水和无菌生理盐水，或者无菌0.2%牛血清白蛋白(BSA)Ⅴ部分。

2. 操作步骤

(1)将10 ml 或不足10 ml 的痰样本置于一支50 ml 螺旋盖的离心管中。

(2)加入等体积的 CPC-氯化钠，盖紧盖子，并用手摇晃试管直至样本溶解。

(3)将样本按规定封好，并将其送到检测实验室。

(4)检测实验室一旦收到样本(允许至少24 h 内完成消化/净化)，用无菌蒸馏水稀释已消化/净化的样本至50 ml，并重新安全地将盖子盖好。将离心管颠倒几次充分混匀。

(5)以≥3000 *g* 离心15 min，弃上清液，将沉淀物悬浮于1～2 ml 无菌水，生理盐水或无菌0.2% 牛血清白蛋白(BSA)Ⅴ部分。

(6)将悬浮起的沉淀物接种于鸡蛋培养基上，同时涂片。

(五)硫酸法

1. 原理 经碱消化剂处理的尿和其他体液在培养时如有污染，可以用硫酸方法处理。

2. 试剂 4% H_2SO_4，4% NaOH，无菌蒸馏水，酚红指示剂。

3. 操作步骤

(1)全部样本以≥3000 *g* 离心30 min。这需要多个离心管。

(2)弃上清液，将同一样本的多个离心管沉淀物收集到一起。

(3)加入等体积的4% 硫酸至沉淀物中。

(4)涡旋器混匀混合物，室温静置15 min。

(5)加无菌水至离心管50 ml 处。

(6)以≥3000 *g* 离心15 min，弃上清液。

(7)向沉淀物中加一滴酚红指示剂，用4% NaOH 中和至指示剂出现稳定的粉红色。

(8)接种到培养基上，同时涂片。

参考文献请扫二维码查阅

第32章 结核分枝杆菌复合群

DAVID M. WARSHAUER, MAX SALFINGER, EDWARD DESMOND, SHOU-YEAN GRACE LIN

（公衍文 译；刘家云、刘文恩 审校）

根据流行病学的基本差异、疾病相关性及体外生长能力，分枝杆菌大体可分为4个主要类别：结核分枝杆菌复合群（*Mycobacterium tuberculosis* complex，MTBC）、麻风分枝杆菌（*Mycobacterium leprae*）、溃疡分枝杆菌（*Mycobacterium ulcerans*）和非结核分枝杆菌（nontuberculous mycobacteria，NTM）。本章介绍MTBC，它可以导致结核病（tuberculosis，TB），包括肺结核、肺外结核、粟粒性结核或潜伏性结核感染。

传染性肺结核患者主要是由结核分枝杆菌（*M. tuberculosis*）引起，其次是牛分枝杆菌（*Mycobacterium bovis*）和非洲分枝杆菌（*Mycobacterium africanum*），它们是疾病传播的主要来源。传染性肺结核的及时诊断（包括耐药检测）和及时治疗有4个目标：①杀死活跃繁殖的细菌以治愈患者；②预防传播；③防止耐药性发展；④杀灭感染组织内的休眠细菌以防止复发。非肺结核病例通常不会传染给社区中的其他人[1]。

一、病原分类和描述

分枝杆菌属是分枝杆菌科中唯一的属，与其他含有分枝菌酸的属有关[2]。除麻风分枝杆菌外，分枝杆菌属DNA的G+C含量较高，为61～71 mol%（麻风分枝杆菌DNA的G+C含量为55 mol%）。该G+C含量与其他含有分枝菌酸的菌属相似，其中，戈登菌属（*Gordonia*）DNA的G+C含量为63～69 mol%，冢村菌属（*Tsukamurella*）DNA的G+C含量为68～74 mol%，诺卡菌属（*Nocardia*）DNA的G+C含量为64～72 mol%，红球菌属（*Rhodococcus*）DNA的G+C含量为63～73 mol%，慢反应脂肪酸菌属（*Segniliparus*）DNA的G+C含量为68～72 mol%[3-4]。

结核病是由一群关系密切、生长缓慢的分枝杆菌引起的，它们被统称为结核分枝杆菌复合群，结核分枝杆菌复合群可以感染包括人类在内的多种哺乳动物。

结核分枝杆菌复合群包括结核分枝杆菌（*M. tuberculosis*）、牛分枝杆菌（*M. bovis*）、牛分枝杆菌卡介苗（*M. bovis* bacillus Calmette-Guérin，BCG）、山羊分枝杆菌（*Mycobacterium caprae*）、非洲分枝杆菌（*M. africanum*）、海豹分枝杆菌（*Mycobacterium pinnipedii*）、田鼠分枝杆菌（*Mycobacterium microti*）、卡内蒂分枝杆菌（*Mycobacterium canettii*）、"獴分枝杆菌"（*Mycobacterium mungi*）、羚羊分枝杆菌（*Mycobacterium orygis*）、蹄兔杆菌（dassie bacillus）、黑猩猩杆菌（chimpanzee bacillus）及"狐獴分枝杆菌"（*Mycobacterium suricattae*）。结核分枝杆菌复合群的成员具有相同的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）图谱，且一些成员的16S rRNA基因序列具有99%的同源性[5]。尽管具有这些相似之处，结核分枝杆菌复合群的成员在形态学、生物化学、宿主谱、动物疾病模式、抗菌药敏试验、地理范围及流行病学方面仍存在差异。

利用二代测序、数字DNA杂交和平均核苷酸一致性检测等方法，Riojas等研究了结核分枝杆菌复合群各种类型的菌株，建议将目前公认的结核分枝杆菌复合群成员都归为结核分枝杆菌（*M. tuberculosis*）[6]。例如，将非洲分枝杆菌（*M. africanum*）称为结核分枝杆菌非洲变种（*M. tuberculosis* var. africanum）。

虽然市售的核酸扩增试验（NAAT）通常无法区分结核分枝杆菌复合群的成员，但是利用特异性的引物通过某些测序方法可以区分复合群的不

同菌种。

二、流行病学与传播

分枝杆菌属包括专性致病菌(obligate pathogens)、机会致病菌(opportunistic pathogens)和寄生菌(commensals)。尚不清楚结核分枝杆菌复合群是否会在自然界的无生命环境中繁殖，它们主要存在于人类和其他温血动物的组织中。当肺结核患者咳嗽时，结核分枝杆菌可存在于患者咳出的空气颗粒(飞沫)中，颗粒大小 1～5 μm，悬浮于空气气流中，当易感人群吸入带菌飞沫后可引起感染。一旦进入肺泡，这些病原体就会被肺泡巨噬细胞吞噬。

(一)结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)

结核病是全球范围内第九大死因，也是单一传染源疾病的主要死因，高于 HIV/AIDS。根据世界卫生组织 2017 年的报告，全球约有 1/3 的人口处于潜伏性结核感染状态，相当于约 24 亿人[8]。据估计，2016 年 1040 万新发结核病例中分别有 130 万例 HIV 阴性患者和 37.4 万 HIV 阳性患者死于结核病。令人担忧的是，耐多药结核病(multidrug-resistant tuberculosis，MDR-TB)的比例逐渐升高(共计 490 000 例；新发病例 4.1%，既往治疗病例 19%；有 47%的耐多药结核病例发生在中国、印度和俄罗斯)和广泛耐药结核病(extensively drug-resistant tuberculosis，XDR-TB)的不断增加，与耐药结核分枝杆菌合并 HIV 感染的问题一样特别值得关注。MDR-TB 被定义为对异烟肼和利福平具有耐药性。XDR-TB 被定义为对异烟肼、利福平、任何一种氟喹诺酮及至少一种注射用二线抗结核药(如卡那霉素、卷曲霉素或阿米卡星)具有耐药性。

2016 年，美国报道了 9287 例新发结核病例，与 2015 年相比下降了 2.7%，创造了年新增结核病例的最低纪录。美国 2016 年的结核病发生率是 2.9/10 万，与 2015 年相比略有下降。然而，流行病学模型表明，如果继续维持如此低的下降率，美国在 21 世纪内消灭结核病(1 例/100 万人口)的目标将无法实现。

(二)牛分枝杆菌(*M. bovis*)

牛分枝杆菌(*M. bovis*)会在包括牛、鹿和麋鹿在内的温血动物中引起结核病，并可传播给灵长类动物和人类。在 19 世纪，欧洲多达 30%的结核病例是由牛分枝杆菌引起的，感染主要是由吸入受感染的牛的飞沫和食用受污染的未经巴氏消毒的乳制品[10]所引起。1917 年，美国和其他资源丰富的国家开始实施牛奶巴氏灭菌法和牛群控制计划，牛和人类身上的牛分枝杆菌被消灭。2002 年，美国牛的结核菌素皮肤试验(tuberculin skin test，TST)阳性率不到 0.02%；2008 年，在加利福尼亚州参与检测的 377 000 头牛中，阳性率不足 0.002%。一项有关人类结核病的研究估计，1995—2005 年，美国仅有 1.4%的结核病例是由牛分枝杆菌引起的，每年约有 230 例，其中大多数是在美国以外出生的人。但是，最近在美国的一些地区，如与墨西哥接壤的地区，以及出生于墨西哥的纽约市人，牛分枝杆菌的感染率显著高于全美国。在加利福尼亚州的圣地亚哥，2004－2007 年经培养确认的结核病患者中，8%的结核病是由牛分枝杆菌引起的，而在结核病患儿中，牛分枝杆菌的感染率超 45%，这主要是由于食用未经巴氏消毒的奶酪产品导致的[13]。

易感染牛分枝杆菌的人群主要是从事与牛、野牛、鹿、麋鹿或这些动物的产品(如皮革、牛奶或肉类)有关工作的人群。喝生牛奶(未经巴氏消毒的牛奶)或食用由生牛奶制成的乳制品的人也容易被感染[14]。

(三)牛分枝杆菌卡介苗(*M. bovis* BCG)

牛分枝杆菌活的减毒卡介苗菌株被用于结核病预防接种。值得注意的是，该菌株在大多数宿主中均无致病性。在高流行地区进行预防接种主要是为了防止幼儿传播性疾病。幼儿接种疫苗可使结核病的发病率降低 60%～80%[15]。在世界许多地区，卡介苗仍用于疫苗接种。但在流行率低的国家，如美国和其他资源丰富的国家，不再接种 BCG 疫苗。该菌株由艾伯特・卡尔梅特(Albert Calmette)于 1924 年传播至世界各地的实验室，并通过连续传代得以在体外保存。当前，出现了一种 *BCG* 基因异质性菌株(http://bcgatlas.org)[16-17]，除毒力减弱外，其主要特性与牛分枝杆菌一致[18]。

牛分枝杆菌基因组大小为 4 374 522 bp，包含近 4000 个蛋白质编码基因，其中有 58 个存在于由 2 个独立串联重复产生的双拷贝中，即 DU1 和 DU2。另外，在 BCG 菌株中发现了编码 σ 因子和多效转录调节因子（如 PhoRn 和 Crp）基因的突变。随着该菌基因的复制扩增，这些突变会影响基因的表达水平和免疫原性，并可能对防范结核病的能力产生影响，这表明早期的 BCG 疫苗或许优于后期更为广泛使用的 BCG 疫苗[19]。

（四）山羊分枝杆菌（*M. caprae*）

山羊分枝杆菌（*M. caprae*）曾被称为结核分枝杆菌山羊亚种（*M. tuberculosis* subsp. *caprae*）[20]和牛分枝杆菌山羊亚种（*M. bovis* subsp. caprae）[21]。最初认为，相对于牛来说，该菌的宿主更倾向于山羊。山羊分枝杆菌感染亦见于绵羊、猪、野猪、赤鹿和狐狸[22]。在德国，1999—2001 年，31%的人结核病例由该菌引起，且症状主要为肺部表现[21]。

（五）卡内蒂分枝杆菌（*M. canettii*）

Van Soolingen 等[23]和 Pfyffer 等[24]分别首次报道了卡内蒂分枝杆菌（*M. canettii*）导致的儿童淋巴结炎和 HIV 阳性患者的“全身性结核病”，并描述该菌为“光滑的结核杆菌”。事实上，上述 2 位患者均在非洲暴露于该菌，随后 Djibouti[25]报道了多起颈淋巴结炎病例，支持了 *M. canettii* 在非洲更为流行的假设。

（六）海豹分枝杆菌（*M. pinnipedii*）

2003 年，Ccosins 等[26]基于宿主选择性及表型和基因型等特点，定义了另一个结核分枝杆菌复合群成员海豹分枝杆菌新种（*M. pinnipedii* sp. nov.）。鳍脚类动物似乎是其自然宿主，但同时该菌对豚鼠、兔子、牛也具有致病性。“海豹杆菌（seal bacillus）”也能感染动物园的动物，如骆驼（双峰驼）和貘（印度貘）[27]。最近，TST 和 IGRA[28]证实，海豹分枝杆菌感染可在貘间传播[27]，亦可由海狮传染给人类。

（七）潜伏性结核感染

全世界约有 1/3 的人口存在潜伏性结核感染（latent tuberculosis infection，LTBI）。根据 2011—2012 年美国健康与营养调查（6083 名 6 岁以上的人参与该调查）的全美代表性数据，按照患病率 4.2%估算，美国潜伏性结核感染的人数约为 1120 万。潜伏性结核感染可以根据 TST 和 QuantiFERON-TB Gold In-Tube（QFT-IT）试验结果进行判断[29]。LTBI 非常重要，因为 LTBI 患者是人群中 MTBC 的主要储存库。结核分枝杆菌感染者终身进展为活动性结核的风险为 5%～10%。但免疫系统受损的人群，如感染 HIV、营养不良或糖尿病患者，从潜伏性结核感染进展为活动性疾病的风险要高得多。例如，同时感染 HIV 和结核分枝杆菌的患者一年内发展成活动性结核病的风险高达 10%[31]。

三、临床意义

（一）结核分枝杆菌复合群

尽管结核分枝杆菌复合群成员的表型和哺乳动物宿主范围不同，但其基因有极高的同源性，仅有 0.01%～0.03%的同义核苷酸突变，且它们之间没有明显的基因交换迹象[32-34]。因此，将分枝杆菌鉴定至种的水平不仅仅是一个学术问题，更是出于流行病学、公共卫生和治疗方面的需要。

（二）结核分枝杆菌

在工业化世界中，结核在缺医少药的少数族裔、城市中贫穷无家可归者、监狱囚犯、酗酒者、静脉吸毒者、老年人、来自高患病率地区的外国人和接触过活动性肺结核的人群中有相对较高的患病率。HIV 感染是潜伏性结核感染发展为活动性结核的最强危险因素。HIV 与结核分枝杆菌，尤其是耐药结核分枝杆菌的混合感染，曾造成暴发流行，病死率极高。除此之外，MDR-TB 和 XDR-TB 的出现对全球结核的变迁模式产生了巨大影响[35]。结核进展可能性高的人群包括缺乏医疗条件的人群、2 年内有感染史的患者、4 岁以下的婴幼儿和胸部 X 线片显示有胸部纤维化和（或）癌性改变的患者。

成人结核以慢性炎症、干酪样坏死和空洞形成为特点，进展缓慢。肺部病灶可破裂进入支气管，造成大量病菌向其他肺部组织扩散，并可通过咳嗽形成气溶胶，被他人吸入后导致感染。肺结核的重要临床症状为咳嗽、体重减轻、盗汗、低

热、呼吸困难和胸痛。结核分枝杆菌感染的肺外临床表现包括颈淋巴结炎、胸膜炎、心包炎、滑膜炎、脑膜炎及皮肤、关节、骨和内脏的感染[36]。AIDS患者肺部病变的影像学表现与一般肺结核不同，且通常进展迅速。这些患者结核的肺外表现和播散更多见，有时甚至不形成肉芽肿[36]。粟粒性结核是一种播散性结核病，当结核杆菌进入血流并被带到身体的各个部位时，它们就会在定植部位生长并在多个部位引发疾病。粟粒性结核患者的胸部X线看起来像是粟粒种子散布在整个肺部[37]。

(三)牛分枝杆菌(*M. bovis*)

牛分枝杆菌引起的人类疾病与结核分枝杆菌所引起的非常类似，除吡嗪酰胺(牛分枝杆菌对其天然耐药)外，治疗方法亦参照结核分枝杆菌感染。这是MTBC分类要具体到种的原因之一。

(四)牛分枝杆菌卡介苗(*M. bovis* BCG)

在世界许多地区仍将牛分枝杆菌卡介苗用于预防接种。鉴于BCG强大的免疫刺激作用，BCG可以用于肿瘤的免疫治疗，将BCG滴入膀胱也可用于治疗膀胱癌[16,18,38]。但在极少数情况下，这种治疗方式的并发症之一就是BCG的扩散。一些接受过BCG治疗的膀胱癌患者的不同器官可能会感染牛分枝杆菌。重要的是区分牛分枝杆菌与牛分枝杆菌BCG[39]。由于接种结核疫苗而导致的播散性卡介苗感染是一种罕见的并发症，每百万疫苗接种的发生率为0.06～1.56例，且仅发生在免疫缺陷患者中。虽然对这些播散性卡介苗感染患者进行了深入的抗结核治疗，但是这些患者仍预后不良，病死率高达70%[40]。牛分枝杆菌和牛分枝杆菌卡介苗所致疾病与结核分枝杆菌病的快速区分，对医疗保健体系不同层级的优化治疗、随访及采取其他控制措施至关重要。

(五)非洲分枝杆菌(*M. africanum*)

在西非，近一半人类结核病例由非洲分枝杆菌引起。非洲分枝杆菌感染在患者特点和免疫流行病学特征方面与结核分枝杆菌不同[41]。其他洲的一些国家，如美国，亦有该菌感染的病例报道，但此类病例大部分均有非洲居住史[42]。

(六)山羊分枝杆菌(*M. caprae*)

山羊分枝杆菌(*M. caprae*)已经从牛、猪、鹿、野猪、骆驼和野牛的结核病灶中分离出来。其也可以引起人类结核病，1999－2001年，德国31%的人结核病例由该菌引起[21]。

(七)田鼠分枝杆菌(*M. microti*)

田鼠分枝杆菌(*M. microti*)首次分离自啮齿动物，如田鼠和鼩鼱，该菌引起的自然获得性结核亦见于豚鼠、兔、美洲驼[43-44]、猫[45-46]、狐獴[47]和其他温血动物及人类[48-50]。

(八)卡内蒂分枝杆菌(*M. canettii*)

卡内蒂分枝杆菌(*M. canettii*)分离株是Georges Canetti在1968－1970年间从法国、马达加斯加和塔希提岛的3例患者体内获得的。2002年，非洲报道了*M. canettii*感染引起的肺部表现[51]。2009年，在一名居住在美国的苏丹难民身上首次发现了由该菌引起的脑膜炎[52]。

(九)海豹分枝杆菌(*M. pinnipedii*)

海豹分枝杆菌感染可表现为淋巴结、肺、胸膜、脾的肉芽肿病变，且该病变能够蔓延传播。

(十)獴分枝杆菌(*M. mungi*)

“獴分枝杆菌”在2010年被定义为带状猫鼬[缟獴(*Mungo mungo*)]的结核病病原体[53]，在猫鼬的鼻内发生肉芽肿性病变，少数病例呈播散性[54]。

(十一)羚羊分枝杆菌(*M. orygis*)

2012年，羚羊分枝杆菌被定义为MTBC的一个种或亚种[55-56]。宿主的范围包括非洲大陆[57]上的羚羊、瞪羚、水牛、水鹿，南亚的牛、恒河猴，以及人类。人感染后的症状与一般结核病没有区别，曾报道过一例羚羊分枝杆菌从人传播到牛的病例[58]。

(十二)MTBC中的新物种(novel proposed species within the MTBC)

1. *M. suricattae* 2013年，在野生的猫鼬身上发现了“*M. suricattae*”，在猫鼬身上引起肉芽肿

性病变[59]。

2. 蹄兔杆菌(*dassie bacillus*) 蹄兔杆菌是从南非啮齿动物岩蹄兔(*Procavia capensis*)分离的一种分枝杆菌菌株[60-61]。

3. 黑猩猩菌株(*chimpanzee strain*) 黑猩猩菌株是从科特迪瓦的野生黑猩猩中分离获得,比较基因组和系统基因组分析表明,该菌株属于MTBC的新谱系,与其他经典的动物相关谱系相比更接近人类相关谱系6(也被称为西非非洲分枝杆菌2)[62]。

四、样品的安全处理、收集和存储

(一)实验室安全

MTBC具有非常低的感染剂量[50%的感染剂量(ID_{50})<10 AFB(抗酸杆菌)]。因此,任何来自疑似或已知结核病例的标本都必须被视为具有潜在传染性,并应采取适当的预防措施进行处理[63-64]。微生物实验室和生物医学实验室的生物安全文件规定,不产生气溶胶的操作流程(如制备抗酸染色的涂片)需要生物安全2级(BSL2)的操作程序和密闭的设备、设施。临床样品的所有处理(如去污染和浓缩)都必须在BSL2或BSL3实验室的生物安全柜中进行[65]。MTBC培养则需按照BSL3级的操作程序,密闭的设备和设施[63]。但是,一个由CDC召集的蓝丝带专家组建议,对于不具备BSL3设施设备却又必须检测MTBC的实验室,可以在BSL2实验室中进行但必须执行BSL3的操作程序[66]。这要求所有与MTBC培养有关的工作都必须在生物安全柜中进行,且实验室内的空气必须排到实验室外部。而且需要进行风险评估,确认在独立的、封闭式的BSL2实验室中采用BSL3操作程序能够安全地进行MTBC培养,并且得到实验室负责人的批准[66]。由于实验室之间的检测范围和规模相差很大,故每个实验室都必须执行自己的风险评估,以确定其预防措施。有关实验室的安全在第13章和第31章有更详细的描述。

(二)标本

由于肺结核是最常见的结核病形式,故分枝杆菌实验室收到的大多数标本来自呼吸道。这些标本中大多数是痰(包括咳痰和诱导痰)、支气管抽吸物、支气管肺泡灌洗标本和气管抽吸物。美国胸科学会(ATS)、美国疾病预防控制中心、美国传染病学会(IDSA)和美国国家结核病控制协会发布的指南建议每隔8～24 h收集3份痰标本,其中至少一份是晨痰以提高诊断的敏感性[67]。第1份标本抗酸涂片的敏感性为53.8%,2份痰样本的敏感率增加为64.9%,3份痰样本增至65%～70%[67]。在伦纳德(Leonard)等的一项研究中,经痰培养证实的结核病患者,对一份痰标本培养的敏感性为91%,2份痰标本提高到98%,3份痰标本提高到100%[68]。虽然Meta分析显示,第3份痰标本的检出率较低,但是在美国仍沿用3份标本作为标准做法[67,69]。美国CDC建议至少有一份标本为清晨第1份标本,因为其敏感性比其他单份标本高12%[69]。收集的痰量应为5～10 ml,少于3 ml会降低涂片和培养的敏感性[67]。

某些体液,如脑脊髓液和腹膜透析液,可能包含非常少量的分枝杆菌。增大标本量(如5～10 ml的脑脊液,10～15 ml的腹膜透析液)将增加MTBC培养成功的机会。

对标本采集的人员进行适当的培训,让他们了解分枝杆菌检测的标本类型及标本量是非常重要的。他们必须知道实验室标本拒收的标准(如混合痰,标本量不足或标本转运时间过长)。标本采集后最好在1天内送到实验室[70]。当收到不合格标本,实验室必须尽快告知临床,以便获得高质量的标本。第31章详细介绍了标本收集、运输和存储指南。

五、直接检查

(一)显微镜检查

显微镜检测抗酸杆菌(acid-fast bacilli,AFB)包括荧光法和基于石炭酸品红的染色法。在石炭酸品红染色方法中,最广泛使用的方法有2种:齐-内(Ziehl-Neelsen)染色法,在染色过程中需要对载玻片进行加热;另外一种是Kinyoun冷染法,染色过程中无须加热。对这些染色方法的敏感性进行评估发现荧光染色最敏感,其次是齐-内染色法,然后是Kinyoun法[71-72]。发光二极管(LED)显微镜在荧光显微检查中应用得越来越普遍,具有光线强、分辨率高、灯泡寿命长(可长达数千小

时)且发热量极低等优点。

对于结核分枝杆菌复合群检查,以下做法值得借鉴:在工业化国家,AFB显微镜涂片检查是使用去污染和离心后的浓缩标本,这比使用未浓缩痰标本直接涂片更为敏感[73]。虽然核酸扩增试验(NAAT)比AFB显微镜镜检更为敏感,但依然建议继续使用显微镜镜检,原因在于:①AFB显微镜检查比NAAT法便宜;②AFB显微镜检查结果有助于解读NAAT结果[74];③AFB涂片显微镜检查在感染确诊和治疗监测方面仍被认为具有参考价值。因此,AFB显微镜检查结果对于决定是否解除隔离仍然有用[75]。第31章详细介绍了AFB显微镜镜检。

(二)核酸扩增试验

美国CDC建议使用核酸扩增试验(nucleic acid amplification tests,NAAT)检测疑似结核病患者标本中的MTBC[74]。通过直接在临床样品中快速、敏感地检测MTBC,NAAT有助于早期明确诊断和及时治疗结核病。与AFB显微镜相比,NAAT对MTBC检测更为敏感,并且可以特异性地检测其他分枝杆菌[74,76]。Peralta等的研究[76]显示,增加NAAT检测可以减少治疗前的等待时间并减少疾病传播。

鉴于NAAT价格相对昂贵,2009年,美国CDC建议继续使用培养和AFB显微镜检查,并不建议所有样本都使用NAAT。即仅对有结核病体征和症状的患者进行NAAT检测,而对结核病可能性极低的患者不建议进行检测。总体而言,NAAT可以帮助确定接触者排查的优先级别,协助做出呼吸隔离的决策及减少不必要的结核病治疗,进而降低医疗成本。

2种商业的NAAT检测体系已获得美国FDA的批准。其中一种(Gen-ProbeHologic直接扩增结核分枝杆菌)使用转录介导的扩增[77],而另一种(Cepheid Xpert MTB/RIF)使用带有分子信号探针的自动化实时PCR系统[78]。此外,还有尚未获得美国FDA批准但市场有售的NAAT系统[79-81],其中一个与Cepheid Xpert MTB/RIF系统相似,设计用于检测与结核病治疗药物耐药性相关的突变[79]。美国FDA批准Cepheid Xpert MTB/RIF系统用于涂片阳性和涂片阴性的原始痰或处理过的浓缩痰标本的检查。过去,疑似结核病患者隔离的取消需要基于痰涂片的多个连续阴性结果,而NAAT可以帮助做出取消疑似结核病患者的隔离决定[82]。根据提交给美国FDA的数据,对于AFB涂片阳性的肺结核患者,单次Cepheid Xpert MTB/RIF检测的阴性预测值为99.7%。据报道,在一项多中心的研究中,一种新版市售分子信号探针检测系统表现出更高的敏感性[83]。但是需要注意的是,用于NAAT检测的标本要确保正确采集。对于涂片阴性但培养阳性的标本,NAAT检测2份标本比检测1份标本有更高敏感性。不管NAAT的结果如何,都需要连续收集痰标本用于分枝杆菌的培养和AFB显微镜检查,因为结核杆菌进一步的表型特征和药物敏感试验都需要基于阳性的培养结果。Gen-Probe Hologic Direct被美国FDA审批用于检测涂片阳性和涂片阴性的痰、支气管标本抽吸物和气管抽吸物。由于商业在售的NAAT体系具有标准化的实验方案和经优化的质量控制,且据报道实验室自行研发的NAAT方法诊断准确性差异较大[84],因此,相对于实验室自己开发NAAT体系,商业在售的NAAT系统是首选。对于非呼吸性标本,NAAT也可能有用,但实施起来更困难。Maynard-Smith等的综述提到商业化的分子信标测定法可在绝大多数抗酸涂片阳性的肺外样本及约2/3的MTBC培养阳性但涂片阴性的样本中检测到MTBC[85]。最近在一项针对脑脊液的研究中,Rufai等发现,相比于选择性液体培养,商业分子信标测定的敏感性为55.1%[86]。然而,Bahr等的研究发现新的Cepheid Xpert MTB/RIF Ultra产品比传统培养和老版的Cepheid Xpert MTB/RIF敏感性更高[87]。在美国,分枝杆菌实验室可能很难就此对肺外样本进行验证,因为大多数美国实验室收到的样本数量可能太少,无法对一些有意义的参数进行测定,如敏感性和特异性等。

美国卫生与公共服务部于2010年发布的《健康人民2020》为改善所有美国人的健康提出了有证可循的10年国家目标。《健康人民2020》中只有一个与结核病实验室有关的目标[88]——提高已经培养确认的结核病患者在采集标本后2天内得到一份NAAT阳性报告的比例。在基准年(2008年)该比例是32%。新的目标是到2020年该比例达到77%。根据在公共卫生实验室进行的检测,

2015 年这一目标已实现 46%[70]。

六、分离程序

分枝杆菌培养是检测 MTBC 最敏感的方法，能够检测低至 10 个分枝杆菌/ml 的标本。痰培养的敏感性约为 80%，特异性为 98%[89-90]。培养假阳性可能有多种原因，如样品处理过程中的交叉污染，仪器或试剂的污染，样品的标签错误或在处理过程中样品被更换。标本培养以获得分离株对药敏测试、菌种鉴定和基因分型非常重要。

MTBC 生长缓慢，来自非无菌部位的标本（如痰）需要去污染以杀死内源性非分枝杆菌的菌群。商业化的液体培养基中包含抗生素，以抑制可能在去污染过程中未能清除的除分枝杆菌外的其他微生物。相比固体培养基（如 Middlebrook 7H10、Middlebrook 7H11 和 Lowenstein-Jensen），液体培养基的 MTBC 检出率更高且更快速（1 周 *vs.* 3 周）[89]。液体培养基孵育至少 6 周才可报告阴性培养结果。但是一项多中心研究表明，诊断性标本在培养的 28 天内可 100%检出 MTBC，随访标本培养则需 35 天[89]。

第 31 章详细讨论了分枝杆菌的培养方法。

七、鉴定

快速检测和鉴定 MTBC 是临床分枝杆菌实验室一项至关重要的任务。传统的 MTBC 鉴定基于生长速度、菌落形态、色素沉着和生化试验，这可能需要数周才能完成。现在使用分子生物学方法，如商品化的核酸探针、实验室开发的基于 PCR 的 DNA 测序、质谱法（MALDI-TOF MS）和高效液相色谱法（HPLC），对培养基中分离出的 MTBC 迅速做鉴定。如果实验室没有可用的分子方法，培养阳性的标本应送至可使用分子鉴定方法的公共卫生实验室或参考实验室。

（一）表型方法

表型鉴定方法的主要作用在于为后续的鉴定试验提供指导或确认分子鉴定结果。MTBC 属于缓慢生长的分枝杆菌，培养需要 7 天以上才能生长起来。MTBC 菌落呈米白色，大多数菌种产生粗糙而干燥的菌落。图 32-1 是在 Middlebrook 7H10 培养基上生长旺盛的结核分枝杆菌菌落。非洲分枝杆菌菌落与结核分枝杆菌相似，生理生化特性介于结核分枝杆菌和牛分枝杆菌之间。牛分枝杆菌卡介苗的菌落扁平，呈圆形，边缘不规则且生长发育不良（图 32-2）。牛分枝杆菌也有相似的生长特性。在 37℃ 固体培养基上，獴分枝杆菌会在 5～6 周内有少量菌落生长，而田鼠分枝杆菌通常在培养基中无法生长，但在染色涂片中会产生特征性的“羊角面包状”细菌形态（图 32-3）。由于卡内蒂分枝杆菌呈现出光滑、圆形且有光泽的菌落特点（图 32-4），使其明显不同于结核分枝杆菌复合群的其他成员，甚至被误以为是非结核分枝杆菌（NTM）。在极罕见的情况下，卡内蒂分枝杆菌也会出现类似于结核分枝杆菌稳定、粗糙的菌落形态。

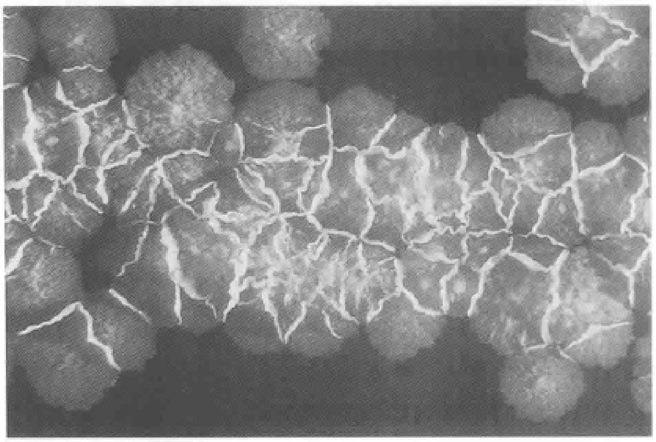


图 32-1 Middlebrook 7H10 琼脂上的结核分枝杆菌。注意这些干燥和粗糙的菌落，有时表面呈结节状或有褶皱，见彩插

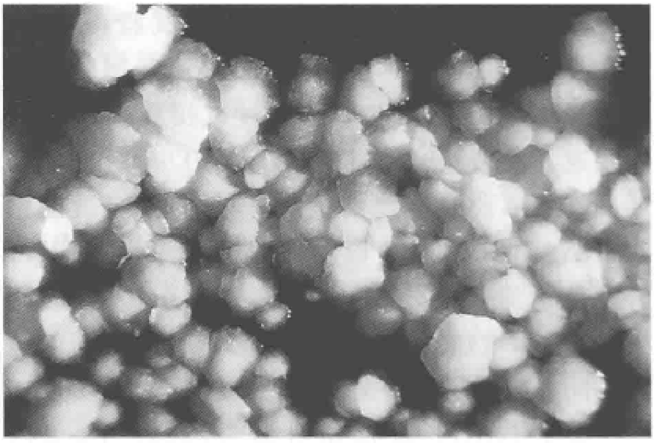


图 32-2 Middlebrook 7H10 琼脂上的牛分枝杆菌卡介苗。菌落圆形平滑，边缘不规则，见彩插



图 32-3　抗酸染色(齐-内)的田鼠分枝杆菌。注意其典型的弧形("羊角面包状")镜下细菌形态,见彩插

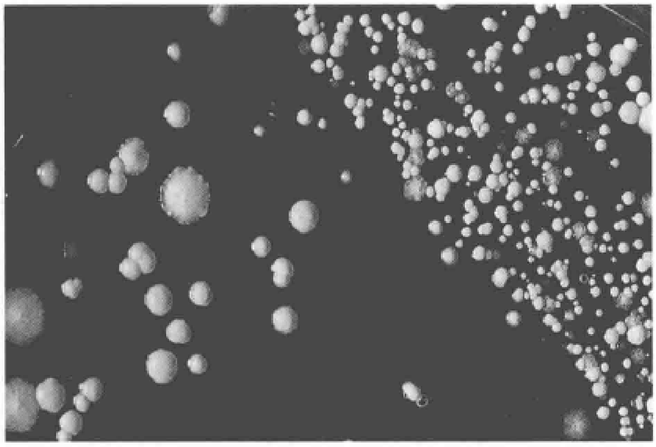


图 32-4　Middlebrook 7H10 琼脂上的卡内蒂分枝杆菌。注意菌落形态的异质性,部分由平滑的菌落组成,但主要为半球形且有光泽的菌落(图片由 D. Van Soolingen 友情提供),见彩插

表型试验如烟酸聚集试验和硝酸盐还原试验,过去一直用于 MTBC 的鉴定,但如今在美国的实验室已很少使用。

为获得明确的菌种鉴定结果,应优先考虑选择分子方法而非表型方法。另外,MTBC 的某些成员,包括非洲分枝杆菌、田鼠分枝杆菌、海豹分枝杆菌和卡内蒂分枝杆菌,只能通过分子试验鉴定。

(二)分子生物学方法

1. 核酸探针(nucleic acid probes)　美国 FDA 批准的商业化的探针方法可用于鉴定培养基上分离的结核分枝杆菌复合物及鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、鸟分枝杆菌复合群、戈登分枝杆菌和堪萨斯分枝杆菌(AccuProbe; Hologic, San Diego, CA)。它能够检测出结核分枝杆菌复合物,包括结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、牛分枝杆菌卡介苗、非洲分枝杆菌、田鼠分枝杆菌和卡内蒂分枝杆菌,但是无法进一步区分这些菌种(AccuProbe package insert 102896; Hologic, San Diego, CA)。探针方法不够敏感,无法直接从临床标本中鉴定分枝杆菌,优点是适用于经液体 7H9 培养基或固体培养基(如 Lowenstein-Jensen 斜面和 Middlebrook 7H10 和 7H11 平板)培养的分枝杆菌。

核酸探针是基于互补的核酸链可以特异性配对并形成稳定的双链复合物,然后通过化学发光标志物对其进行检测。AccuProbe 未获美国 FDA 批准用于阳性的 MGIT 肉汤,但是已有实验室对该方法进行了验证。据报道,使用探针从阳性的 MGIT 肉汤中鉴定 MTBC 的准确性>95%[91]。

2. 基于 PCR 的测序(PCR-based sequencing)　核酸扩增和测序已成为 MTBC 和 NTM 的金标准。16S rRNA 基因是最常用的基因,但是可能需要对其他基因进行测序才能区分某些分枝杆菌。鉴定和区分 MTBC 可以通过 *gyrB* 或缺失分析来完成[91-93]。测序数据分析需要高质量的数据库。可用的数据库包括 NCBI GenBank、MicroSeq (Thermo Fisher Scientific)、集成数据库网络系统(SmartGene, Raleigh, NC)和 RipSeq(Pathogenomix, Santa Cruz, CA)。这些数据库尚未获得美国 FDA 许可,故实验室必须将使用这些数据库的测序检测作为实验室自建项目进行验证。CLSI 提供了开发和解释核酸测序分析的指南[94]。核酸测序详见第 31 章。

3. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)　在美国有 2 种商用 MALDI-TOF MS 系统,分别是 MALDI Biotyper(Bruker Daltonics, Billerica, MA)和 Vitek MS(bioMérieux, Durham, NC)。Vitek MS 具有美国 FDA 许可的数据库,而 MALDI Biotyper 拥有用于分枝杆菌研究的数据库[95]。作为自建项目,实验室可以利用获得的图谱建立科研用数据库,并对该数据库进行验证。商业 MALDI-TOF MS 系统为提高其性能,已在其数据库中添加了大量的图谱和物种信息。

由于分枝杆菌细胞壁的特性,在将菌种点到靶板上之前需要一个提取步骤。通常需要在乙醇、甲酸和乙腈中进行磁珠破碎或涡旋[96-97]。验

证提取过程是否杀死 MTBC 很重要。然后再将提取的蛋白质点样到板上。提取过程最好在 BSL3 实验室进行，如果没有可用的 BSL3 实验室，提取程序可在 BSL2 实验室进行但需执行 BSL3 程序。

多项研究表明，MALDI-TOF MS 能够鉴定 MTBC 和其他分枝杆菌[96-100]。但是，无法鉴定 MTBC 到种的水平。MALDI-TOF MS 需要较多菌量，故需要将 MTBC 传代至固体培养基，并可能需要培养 1～3 周，从而导致鉴定延迟。有研究表明，直接用阳性的液体培养基（如 BD MGIT 或 VersaTREK Myco 肉汤）鉴定分枝杆菌会得到不稳定的结果[98-99,101]，对于该方法，确保纯培养很重要，因为混合培养物可能导致无法鉴定，或导致更频繁的鉴定错误。

4. 分子线性探针测定（molecular line probe assays，LPAs） LPAs 可直接从临床标本和培养物中快速鉴定 MTBC。从样品中提取核酸，然后进行扩增并与带有不同探针的硝酸纤维素试纸条杂交，根据模板对试纸条上的图案进行结果解读，从而对 MTBC 和其他分枝杆菌做出鉴定。有很多 LPAs 制造商，包括德国 Nehren 的 Hain Lifescience、比利时根特的 Innogenetics、日本 Nipro 公司及德国斯特拉斯堡的 Autoimmun Diaknostica GmbH，都有用于鉴定 MTBC 的产品，这些产品虽然在欧洲获得了 CE 认证（译者注：CE 为法文 Conformite Europeenne 的首字母缩写，表示“欧洲统一”。CE 标志是一种安全认证标志，凡贴有 CE 标志的产品均可在欧盟各成员国内销售，无须符合各个成员国的要求。使用 CE 标志，实现了商品在欧盟成员国范围内的自由流通，因此，CE 标志被视为制造商打开并进入欧洲市场的通行证），但在美国未获得 FDA 批准。美国的一些实验室已经将商业 LPAs 作为实验室自建项目。

除 15 个 NTM 外，INNO-LiPA Mycobacteria v2（Innogenetics）还可以鉴定 MTBC，而 GenoType Mycobacteria assay（Hain Lifescience）可以鉴定 MTBC 和 13 种 NTM。GenoType MTBC（Hain Lifescience）LPAs 能够从阳性培养物中区分 MTBC 的某些成员，包括结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、牛分枝杆菌卡介苗、非洲分枝杆菌、田鼠分枝杆菌和山羊分枝杆菌。

5. 高效液相色谱法（HPLC） HPLC 鉴定分枝杆菌是由美国 CDC 开发，并于 1990 年被推荐为标准方法[102-103]。HPLC 通过分析细菌细胞壁的分枝菌酸成分鉴定 MTBC，区分牛分枝杆菌卡介苗，鉴别大量 NTM 菌种。HPLC 分析已被其他方法如 MALDI-TOF MS 和测序所取代，因为这些方法有更好的鉴别菌种的能力。

八、分型系统

基因型菌株分型（genotypic strain typing）

控制结核病需要阻断感染的传播。阻断感染的有力工具当然是诊断和治疗活动性结核患者。但结核病的传播大多发生在诊断和治疗之前[104]。因此，追踪结核分枝杆菌的特定菌株在社区中传播有助于增强对感染患者的检测及设计有效的控制策略。

直到 20 世纪 90 年代初，MTBC 菌株的分型还仅限于分枝杆菌噬菌体分型和耐药模式，这些方法分型能力有限。20 世纪 90 年代初，van Embden 等[105]设计了一种标准化的基因分型方法（IS6110 限制性片段长度多态性分型），该方法根据插入序列的数量和位置利用 Southern blotting 进行菌种鉴定。随后一种基于 PCR 的方法（间隔寡核苷酸分型，spacer oligo nucleotide typing）被开发，并与 IS6110 分型联合使用[106]。该 PCR 系统仅需要少量的 DNA，并产生与可靠数据库的构建和使用兼容的数值结果[107]。这种方法增加了分枝杆菌散布重复单位（mycobacterial interspersed repetitive units，MIRU）的使用，这类似于广泛用于其他菌属鉴定的可变数目的串联重复序列技术。随后，24 位点 MIRU 的应用使该系统的辨别能力更加强大[108]。在联合应用标准化的间隔区寡核苷酸分型（spoligotyping）和 24 位点 MIRU 基因分型数年后，结核病控制计划注意到，某些由常见基因型的菌株引起的结核病病例，有时与没有明显流行病学联系的聚类相关[109]。这似乎表明，间隔区寡核苷酸分型-MIRU 基因分型系统没有足够的区分力，导致一些没有在同一传播链中的菌株由于具有相同基因型被聚类。与此同时，二代 DNA 测序变得更快、更经济，从而使全基因组测序（WGS）变得可行[110]。

在本书英文原版发行时，美国 CDC 结核病基

因分型系统对所有提交的结核分枝杆菌复合群均采用 24 位点 MIRU 结合可变数目串联重复(variable number of tandem repeat，VNTR)进行分型。由 MIRU-VNTR 获得快速结果，同时还进行全基因组测序，并根据测序结果计算间隔区寡核苷酸类型。WGS 还可以用于大型聚类的研究，基于普通的间隔区寡核苷酸分型-MIRU 基因分型方法，一些流行病学上并不相关的菌种可能会被聚类在一起，WGS 可以对这些基于基因型聚类进行正确性判断。当 WGS 可以识别真正具有匹配基因型的菌株时，这将减少对患者和接触者的不必要调查，若使用分辨力较低的基因分型方法，则会导致病例和接触者增加。结核病控制计划的工作因此变得更加有效和更加具有成本效益。WGS 的另一个潜在优势是，它可以获得是否存在与耐药相关突变的信息。无论是流行病学分析还是耐药性检测，WGS 数据的处理、存储和解释都需要开发一个更尖端的数据管理结构[110]。

MTBC 患者分离株的通用基因分型已成为结核病控制计划不可或缺的一部分。基因分型结果可用于确定基因型聚类患者之间以前未知的联系，确定以前未知的结核病暴发传播地点，以及确定假阳性培养(可能导致不必要的治疗、人员感染预防和结核病控制计划的不必要调查[111-112])。

九、免疫诊断试验

历史上最早用于诊断 MTBC 感染的免疫诊断试验是结核菌素皮肤试验(TST)。这种试验的不足已众所周知，它不能区分是活动性结核病还是既往接种卡介苗引起的致敏反应，或是不可预测因素及 NTM 引起的交叉反应[113]。现在已有体外血液学试验，可测量 MTBC 抗原体外刺激后 T 细胞释放的 IFN-γ。除了卡介苗和少数 NTM(包括海分枝杆菌、苏氏分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌和戈登分枝杆菌)外，这些抗原对 MTBC 具有特异性。IGRA 比 TST 具有更高的特异性，尤其是对接种卡介苗的个体。有 2 种美国 FDA 批准的市售全血 IGRA，即 T-SPOT. TB(Oxford Immunotec，Oxford，United Kingdom)和 QuantiFERON-TB Gold Plus(QFT-Plus)，后者于 2017 年在美国取代了 QFT-IT(Qiagen，Germantown，MD)。QuantiFERON 通过酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 IFN-γ，而 T-SPOT. TB 是通过酶联免疫斑点试验进行检测。表 32-1 列出了 IGRA 和 TST 的主要特征。需要强调的是，这些试验都不能区分潜伏性和活动性 MTBC 感染，主要用于 LTBI 和非活动性结核病的检测。

表 32-1 QFT-Plus、T-SPOT. TB 和 TST 的比较

特征	QFT-Plus	T-SPOT. TB	TST
所需的就诊次数	1	1	2
方法	酶联免疫吸附试验	酶联免疫斑点试验	迟发型超敏反应
细胞介导的免疫反应测定	$CD4^+$ 和 $CD8^+$ 细胞释放的 IFN-γ(U/ml)	产生 IFN-γ 的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 细胞数(斑点形成细胞)	硬结大小
区分 LTBI 与活动性结核病	不能	不能	不能
交叉反应	海分枝杆菌，苏氏分枝杆菌，堪萨斯分枝杆菌	海分枝杆菌，苏氏分枝杆菌，堪萨斯分枝杆菌，戈登分枝杆菌	各种 NTM
样本	肝素锂抗凝全血或直接加入 4 只试管	从肝素抗凝全血中分离单个核细胞	不需要
抗原	ESAT-6 和 CFP-10[a]	ESAT-6 和 CFP-10	>200 结核分枝杆菌蛋白(PPD[b])
试验方式	4 管：空白对照、丝裂原、TB1 和 TB2 抗原管	96 孔微孔板，包被有 IFN-γ 抗体	NA

（续 表）

特征	QFT-Plus	T-SPOT. TB	TST
接种物	每管 1ml 全血	250 000 个清洗过的 PBMC[c] 分别加入 ESAT-6、CFP-10、空白对照孔和阳性对照孔	皮内注射 0.1ml PPD
出结果时间(h)	24～48	24～48	48～72
>5 岁的免疫功能正常人结核感染的敏感性(%)	88～96[d]	90～95[e]	约 60[e]
<5 岁的免疫功能正常人结核感染的敏感性[e]	与 TST 相比降低	与 TST 相比降低	
免疫功能低下个体结核感染的敏感性[f]	比免疫能力正常个体更不敏感	所受影响小于 QFT Plus	比免疫能力正常个体更不敏感
HIV 感染者结核感染的敏感性[e]	65～100	65～100	43
未接种卡介苗人群结核感染的特异性(%)	>95%	>95%	约 97%
卡介苗接种人群[e] 结核感染的特异性	>95	97～99[g]	约 60
"转换"与"反转"的解读	未建立	未建立	完善的
预测活动性疾病进展的能力	无法识别可能进展为活动性疾病的人	无法识别可能进展为活动性疾病的人	无法识别可能进展为活动性疾病的人

注：[a]TB1 抗原管包被有早期分泌的抗原靶标 6(ESAT-6)和培养物滤液蛋白 10(CFP-10)的长肽，用于刺激 $CD4^+$ T 辅助淋巴细胞。TB2 抗原管包被有 ESAT-6 和 CFP-10 的长肽以刺激 $CD4^+$，以及 6 个专有的短肽以刺激 $CD8^+$ T 细胞。[b]PPD，纯化蛋白衍生物。[c]PBMC，外周血单个核细胞。[d] 参考文献[132-135]的数据。[e] 参考文献[67]的数据。[f] 参考文献[136]的数据。[g] 若以 6 个斑点作为 cutoff 值，特异性为 97%；若以 8 个斑点作为 cutoff 值，则特异性为 99%[67]

有研究表明，对于 5 岁以上有免疫能力的个体，IGRA 对 MTBC 感染的检测敏感性要等于或优于 TST，QFT 检测的敏感性为 81%～86%，T-SPOT. TB 检测的敏感性为 90%～95%，TST 为 71%～82%[67]。在已接种卡介苗的患者中，IGRAs 的特异性（QFT-IT>95%，T-SPOT. TB 为 97%～99%）优于 TST(约 60%)[67]。

IGRA 对幼儿的敏感性范围为 52%～100%[67]。据报道，TST 对儿童的敏感性与 IGRA 相当或更高，年龄越小 IGRA 敏感性越低[67]。在一项针对 NTM 感染儿童的研究中，IGRA 特异性(90%～100%)高于 TST[114]。ATS/CDC/IDSA 指南建议，对于 5 岁以下的健康儿童，应使用 TST 而非 IGRA。但是，这是一个有条件的且证据质量很低的建议。该指南指出，没有足够的证据推荐使用 IGRA 而不是 TST。此外，IGRA 结果不确定的频率通常高于成人，并且难以收集足够的血量用于 IGRA 检测[67,115]。

数据显示，与免疫功能正常的个体相比，无论是 IGRA 还是 TST，检测 HIV 感染者 MTBC 感染的敏感性均较低[67]。QFT-IT 和 T-SPOT. TB 的敏感性为 65%～100%，TST 的敏感性估计为 43%[67]。在 Cattamanchi 等的系统综述中，对于 HIV 感染合并活动性结核的患者，T-SPOT. TB (72%；95%置信区间为 62%～81%)的敏感性略高于 QFT-IT(61%；95%置信区间为 47%～75%)，并且 2 种 IGRA 都不比 TST 敏感[116]。在 Santin 等的一篇综述中，当患者的 $CD4^+$ T 细胞计数<200 时，不确定结果概率(QFT-IT 为 11.6%，T-SPOT. TB 为 11.4%)增加；而当 $CD4^+$ T 细胞计数>200 时，QFT-IT 的不确定结果概率为 3.1%，T-SPOT. TB 为 7.9%[117]。对于严重免疫功能低下的个体，推荐同时使用 IGRA 和 TST 以提高敏感性[67,113]。

免疫介导的炎性疾病(IMID)患者，如狼疮和类风湿关节炎患者，是结核病复发的高危人群。接受肿瘤坏死因子治疗的 IMID 患者的风险可能是其他人群的 12 倍[118]。对 IMID 患者进行

LTBI 诊断，QFT-IT 和 T-SPOT. TB 与 TST 的敏感性相同。服用免疫抑制药的患者 QFT-IT 的敏感性可能降低，不确定的结果可能会增加，而 T-SPOT. TB 似乎受到的影响较小。对高危患者，依次或同时使用 TST 和一种 IGRA 可能会提高敏感性[118]。

高危环境中的美国医护人员(HCW)会进行连续 MTBC 感染的检测以识别新感染个体。已经发表的 2 项大型研究对医护人员的 IGRA 和 TST 结果进行了比较。Dorman 等研究了来自美国 4 家医疗机构的 2563 名医护人员，发现与 TST 相比，IGRA 具有较高的基线和转换率[119]。QFT-IT 的基线患病率为 3.8%，T-SPOT. TB 的基线患病率为 5.0%，TST 的基线患病率为 1.8%。IGRA 转换率是 TST 观察到的转换率的 6～9 倍。他们的研究表明，大多数 TST 和 IGRA 阳性是假阳性。QFT-IT 的易变和转换最常见于初始值刚好低于 cutoff 值的人。当使用相同的血浆样品重复进行酶联免疫吸附测定时，几乎一半 QFT-IT 的新转换不能被重复。该作者得出的结论是，接种 BCG 疫苗的医护人员处于基线时 IGRA 检测有一定价值，但对结核病感染风险低的医护人员进行常规连续检测很可能会导致假阳性转换和不必要的治疗。斯坦福大学医学中心对 9000 多名医护人员的研究发现，使用较早一代的 QFT-IT 测定获得了相似的结果[120]。由于缺乏有关系列检测最佳 cutoff 值的数据及对转换和反转的定义不清楚，使得 IGRA 在系列检测中的使用变得复杂[121]。

2010 年美国 CDC 指南指出，经美国 FDA 批准的 IGRA 检测(包括 QuantiFERON-TB Gold、QFT-IT 和 T-SPOT. TB)可与 TST 一样用于儿童和成人 MTBC 感染的诊断[122]，包括 MTBC 感染风险和发展为活动性结核风险增加的人群(如表 32-2 所示)[122]。这 2 类人均能从 LTBI 治疗中受益。IGRA 还可用于监测目的，进行接触调查，筛查医护人员和其他高危人群的 LTBI，并确定可能从治疗中受益的人。该指南建议在 5 岁以下儿童中使用 IGRA 时应谨慎，尽管对儿童的特异性预期很高。对于低 MTBC 感染风险的健康人，如一些接受连续检测的医护人员，单个 IGRA 或 TST 阳性结果很可能是假阳性。

2017 年，美国 ATS、CDC 和 IDSA 发布了 LTBI 诊断指南[67]。指南建议对 5 岁或以上的人进行 IGRA 检测而非 TST。但是，TST 是可以接受的替代方法，尤其是在 IGRA 不可用、成本太高或负担太重的情况下。表 32-3 总结了他们的建议。

表 32-2　MTBC 感染风险或 LTBI 进展为活动性结核病风险增加的人群[a]

结核感染风险增加的人群	进展为活动性结核病风险增加的人群
与已知或疑似活动性结核病例密切接触者	HIV 感染者
来自活动性结核病高发地区的外国出生者	正在接受免疫抑制疗法的患者(如肿瘤坏死因子 α 拮抗剂、系统性皮质类固醇，或器官移植后使用免疫抑制药)
聚集场所中可能接触高活动性结核感染风险对象的居民和从业者，尤其是在经常性接触或长时间接触的情况下	最近 2 年内曾感染结核分枝杆菌者
曾有活动性结核病高发地区居留史的人员	有未经治疗或未得到充分治疗的有活动性结核病史的患者，包括胸部 X 线片上与先前的结核病一致的纤维化改变的患者
为活动性肺结核高危人群提供服务的医护人员	患有硅肺、糖尿病、慢性肾衰竭、白血病、淋巴瘤、头颈部或肺部癌症的患者
当地定义为结核病感染或活动性疾病发病率增加的人群(如低收入人群、滥用药物或酒精的人群)	做过胃切除术或空肠回肠旁路术的患者
与LTBI 或活动性结核病风险增加的成年人接触过的婴儿、儿童和青少年	体重低于 90%理想体重的人
	吸烟者和滥用毒品或酒精者
	当地定义为活动性结核发病率增加的人群，包括缺乏医疗资源或低收入的人群
	婴儿和 5 岁以下的儿童，若患活动性结核病，预后不良(如脑膜炎、传染性疾病，甚至死亡)的风险增加

注：[a] 摘自美国 CDC 指南，2010[122]

表 32-3 关于 LTBI 检测建议的摘要[a]

分组	检测方法
可能被感染；高进展风险（TST 解释标准≥5 mmol/L）	成人：IGRA 或 TST 均可采用。可考虑同时使用这 2 种方法进行检测，其中任一结果阳性都认为是阳性的 儿童(≤5 岁)：首选 TST，IGRA 或 TST 均可采用。可考虑同时使用 2 种方法进行检测，其中任一结果阳性都认为是阳性的[b]
可能被感染：低或中等进展风险（TST 解释标准≥10 mmol/L）	如果可行，首选 IGRA，IGRA 或 TST 均可采用
不可能被感染(TST 解释标准≥15 mmol/L)	不建议进行 LTBI 检测。如有必要，在可行的情况下首选 IGRA；IGRA 或 TST 均可采用。对于连续检测，IGRA 或 TST 均可采用。考虑重复检测或同时使用 2 种方法进行检测。其中任一结果阴性都认为是阴性的[c]

注：[a] 摘自参考文献[67]。[b] 当初始检测结果为阴性时做第 2 个诊断试验是提高敏感性的一种策略。虽然这可能会降低特异性，但是专家组认为，在漏检 LTBI 的后果(如可能受益于治疗但未获治疗的患者)比进行不适当治疗的后果(如肝毒性)更严重的情况下，这是可以接受的折中方案。[c] 在获得初始阳性结果之后进行验证试验是基于以下事实：假阳性结果在不太可能感染结核分枝杆菌的个体中普遍存在，以及委员会推定对最初检测为阳性结果的人进行第 2 次检测将有助于确定最初的结果是假阳性

十、抗菌药物敏感性试验

耐药性结核的分子检测

抗菌药物敏感性试验是 MTBC 实验室检查的关键组成部分。结核病可以根据临床表现进行诊断，但耐药性结核病(DRTB)只能通过药敏试验进行诊断。MTBC 的抗菌药物敏感性试验主要有 2 种类型，即基于培养的药物敏感性试验(cDST)和分子药物敏感试验(mDST)。基于培养的药敏试验方法包括琼脂比例法[译者注：美国使用琼脂比例法，世界卫生组织(WHO)推荐使用罗氏培养基比例法和罗氏培养基绝对浓度法。我国普遍采用 WHO 推荐的方法]、2 种肉汤系统(MGIT 和 VersaTREK)和 Sensititre 微量滴定稀释法(译者注：国内一般称为"微量肉汤稀释法"或泛称为"微孔板法")。有关 cDST 的详细信息见第 78 章。此处重点介绍分子药物敏感性试验(mDST)。

由于 MTBC 生长缓慢，通常需要 4 周或更长时间才能获得 cDST 结果。而 mDST 可以直接用原始样品或沉渣(处理后的样品)，这显著缩短了获得 mDST 结果的时间[123]，使得临床医生可以尽早调整治疗方案从而能有效治疗 DRTB，改善患者预后并减少 DRTB 传播。表 32-4 列出了进行 mDST 的标准。

在过去的 20 年中，分子技术不仅在耐药性检测的敏感性和特异性方面有所提升，而且在设备和操作程序方面也有所改进，使得临床实验室能够将 mDST 纳入常规工作。一般来说，mDST 可以分为 2 种主要类型，即基于探针的方法和基于测序的方法。

表 32-4 进行 mDST 的标准[a]

标准	解释
怀疑产生耐药性的患者	患者来自 DRTB 高发地区 患者曾与 DRTB 患者接触 患者对治疗无反应，或曾接受过抗结核治疗
广泛暴露	可能有广泛暴露的患者包括学生、医务工作者、疗养院居民、囚犯、军人和其他人
暴露的弱势人群	幼儿、老年人和免疫力低下的人在接触结核病患者后更容易患上结核病
患者的临床情况	患者对一线抗结核药有不良反应，需要测试替代药物，如二线药物
实验室问题	混合培养；培养不可行；由于菌株在培养基中生长不良，cDST 失败；快速确认 cDST 检测到的耐药性。若检测到突变就可以确认已产生耐药性，但未检测到突变并不能排除耐药性；确认 Xpert-MTB/RIF 检测到的利福平耐药
通用	如果 TB-NAAT 呈阳性且有足够的资源

注：[a] 摘自参考文献[137]

Cepheid 的 Xpert MTB/RIF 是一种基于实时 PCR 的盒式分子信标探针测定法，已于 2013 年获得美国 FDA 许可，可用于测试 AFB 涂片阳性和阴性的痰标本(无论是原始的痰还是处理过的沉渣)。美国目前可用的版本只能检测是否存在突变。它无法识别沉默突变(silent mutation)，导致这些沉默突变被错误地解读为利福平耐药。美国 CDC 建议在检测到突变时用测序方法进行确认[124]，这一预防措施特别适用于利福平耐药率低的地区。新版本 Xpert MTB/RIF、Xpert MTB/RIF Ultra 已被 WHO 许可并在许多国家和地区使用，它融合了熔解曲线分析并能够识别某些突变(http://www.who.int/tb/features_archive/Xpert-Ultra/zh/)。LPAs 如 Hain 的 GenoType MTBDRplus 和 GenoType MTBDR*sl*，是另一种可用于检测肺部标本或阳性培养物的商业化探针检测方法。这些检测方法可以识别一些常见突变，并且可以通过野生型条带缺失来鉴别未知突变。

基于测序的方法，如 Sanger 测序[125]、焦磷酸测序[126]、靶向二代测序和 WGS，已被用于耐药性检测。测序方法具备突变识别能力，并使用户能够识别沉默突变、有争议的突变及赋予不同耐药水平的突变。当分离株可用时，实验室可以进行药物 MIC 检测以确定每个突变的耐药性水平。随着新的突变不断被检测，与其相关的 MIC 的建立也在不断发展。

随着 mDST 在诊断实验室中的应用越来越多，mDST 和 cDST 之间的差异已经显现出来。沉默突变不会产生耐药性，具有争议突变的分离株的 cDST 结果常为敏感(表 32-5)。虽然没有突变并不排除耐药性，但在报告之前应采取措施调查假耐药的可能性。第 78 章中提供了一些有用的建议。

自 2009 年以来，美国 CDC 就为耐药分子检测提供了出色的服务，具有检测周期短的优点。用于检测耐药性的基因位点是 *katG* 和 *inhA* 启动子(异烟肼)、*rpoB*(利福平)、*embB*(乙胺丁醇)、*pncA*(吡嗪酰胺)、*rrs*(阿米霉素、卷曲霉素和卡那霉素)、*eis* 启动子(卡那霉素)和 *tlyA*(卷曲霉素)(表 32-5)。检测这些药物耐药性的敏感性为 61%～97%[125]。此外，美国 CDC 的病理科(pathology@cdc.gov)提供了在无法获得培养物时检测固定组织块中病原微生物的服务。如果鉴定出 MTBC，则 DNA 将被转交用于耐药分子检测。

表 32-5　MTBC[a] 的基因和相关耐药突变[a]

抗菌药物	基因	常见突变	不常见的突变	备注
异烟肼(INH)	*katG*	S315T(ACC)	S315T(ACA)，S315T(ACT)，S315N（AAC），S315I(ATC)，S315L(GGC)	S315T(ACC)是耐多药或耐 INH 结核病最常见的突变，导致高水平的 INH 耐药
	inhA 启动子	−15C/T	−8T/C，−8T/A，−8T/G，−9G/T，−16A/G，−17G/T	与低水平的 INH 耐药相关，也可能与乙酰唑胺耐药相关
	ahpC 启动子	−48G/A，−52C/T	−49T/C，−51G/A，−52C/A，−52C/G，−54C/T，−57C/T	与 INH 耐药相关
	*fabG*1	L(CTG)203L(CTA)		与INH 耐药相关，一些具有这种突变的菌株 MGIT 960 检测可能为 INH 敏感
	ndh			耐药频率低
利福平[b](RIF)和利福布汀(RFB)	*rpoB*	可分 4 组： 1. 不常见 2. D516V 3. H526D，H526Y，S531L 4. F514F	可分 4 组(列出的是每组突变的示例)： 1. L511P，D516Y，H526N，L533P 2. S522L，H526L，H526A，H526C，D516F 3. Q513A，Q513E，H526R，S531W，S531F，V176F	• S531L 是 MDR-TB 最常见的突变，导致 RIF 和 RFB 耐药 • F(TTC)514F(TTT)是最常见的沉默突变，可用 XpertMTB/RIF 分析的 B 探针检测，被误认为是 RIF 耐药 当MGIT 检测利福平和利福布汀的临界浓度分别为 1mg/ml 和 0.5mg/ml 时，*rPOB* 突变可被分为 4 组：

（续 表）

抗菌药物	基因	常见突变	不常见的突变	备注
			4. G507G（GGT），G507G（GGA），Q513Q（CAG），K527K（AAA），R528R（CGA），R528R（CGG），R528R(CGT)	·第1组突变被称为"有争议的突变"。具有这些突变的菌株通常cDST检测RIF为敏感，但这些突变的存在可能增加治疗失败或复发的风险，尤其是对INH也耐药时 ·第2组突变导致RIF耐药，但对RFB敏感。一些第2组突变，如S522L和H526I，可能导致RIF耐药且MIC非常接近临界浓度（折点），分离株有时可能检测RIF敏感。因此，第2组的突变可能与第1组重叠 ·第3组突变导致对RIF和RFB的耐药性 ·第4组突变为沉默突变，不产生对RIF或RFB的耐药性
乙胺丁醇(EMB)	*embB*	M306V	M306L，M306I（ATC，ATA，ATT），D354A，G406D	M306V是最常见与EMB耐药相关的突变，但并非所有*embB*突变都与EMB耐药相关
吡嗪酰胺(PZA)	*pncA*	无显性突变		*pncA*突变广泛分布于基因及其启动子区。一些突变，如E37V、D110G、V163A、A170V和V180I，与PZA耐药无关
	panD		I49V，I115T	新的研究指出这些可能与PZA耐药相关，还需要更多的研究来证实
喹诺酮类	*gyrA*	D94G，A90V	D94Y，D94H，D94A，D94N，S91P；G88A	D94G是对喹诺酮类耐药最常见的突变。A90V是第二常见的突变，通常与对较低水平（相较D94G）的喹诺酮类药物耐药相关。莫西沙星可能仍有助于治疗
阿米卡星(AMK)	*rrs*	1401A/G	1402C/T，1484G/T	1401A/G是导致AMK耐药最常见的突变。1402C/T可能与AMK耐药无关。1484G/T可能与AMK耐药相关
卷曲霉素(CAP)	*rrs*	1401A/G	1402C/T，1484G/T	1401A/G是最常见的突变；通常与CAP耐药相关。1402C/T和1484G/T与CAP耐药相关
	tlyA	无显性突变		突变广泛分布于整个基因中。并不是所有的突变都与CAP耐药相关，一些突变如D57H、G196E、N236K，在202位置插入GC，在755位置插入GT，这些突变与CAP耐药相关
卡那霉素(KAN)	*rrs*	1401A/G	1402C/T，1484G/T	1401A/G是最常见的突变，导致高水平KAN耐药。1402C/T与低水平KAN耐药相关
	*eis*启动子	210G/A，212C/T，214C/T，237G/T		与KAN耐药密切相关。212C/T可能导致低水平KAN耐药
贝达喹啉(BDQ)	*atpE*	D28N，A63V		ATP聚合酶C环突变可能与BDQ耐药相关
	mmpR	无显性突变		一项新的研究表明，mmpR突变可能与BDQ耐药相关，但还需要更多的研究来证实

注：[a] 摘自参考文献[138]。[b] 所示*rpoB*密码子和在大肠埃希菌中一样按照惯例编号。在大肠埃希菌中的编号减去81就转换为结核分枝杆菌的编号。例如，S531L突变编号为S450L

十一、评估、解释和结果报告

分枝杆菌涂片荧光染色、液基培养系统和快速鉴定方法如核酸探针、分子线性探针、MALDI-TOF MS等的应用，以及对AFB涂片阳性标本或分离株直接进行基于分子的耐药性检测，对于支持有效的患者护理和管理所需的关键决策而言是最佳选择。正如本章所强调的，MTBC的表型试验用途有限。

样本中分枝杆菌的检测策略很复杂，因为临床实验室可能会使用多种检测方法和多种不同的策略。无论使用何种方法和策略都应确保能尽快检测或排除MTBC。图32-5所示为一种综合诊断策略，适用于疑似结核病患者的标本，以及虽然结核病可能性较低但需要排除诊断的患者的标本[65]。最佳策略的确定取决于设施、人员配备、检测能力及所服务的患者人数。策略的选择要考虑以下要素：需要检测的标本量、所服务的患者人群中结核病和其他分枝杆菌病的患病率（如低患病率）、实验室人员的技能、是否有合适的处理和操作分枝杆菌的设施（如BSL3实验室），以及能否借助参考或公共卫生实验室[65]。

临床微生物学实验室面临一个问题：哪些MTBC检测需要自己做，哪些需要送参考实验室[127]？对于大多数医院的临床微生物学实验室，提供全面的分枝杆菌培养和药敏试验既不必要也不合适。但是，所有医院实验室都应做AFB涂片。当前临床实验室还面临一个问题，即是否要提供诸如Cepheid Xpert MTB/RIF分析或LPA（如GenoType MTBDRplus）等快速诊断检测项目。许多临床实验室选择停止提供全面的分枝杆菌诊断项目，将这些检测项目部分或全部地转交给参考实验室或公共卫生实验室。

准确、及时地报告AFB镜检结果，MTBC的分子检测结果，耐药突变的检测、培养、鉴定和cDST结果对于临床上采取有效治疗措施和实施适当的公共卫生和感染控制措施至关重要。美国CDC指南建议AFB涂片镜检结果应在24 h内报告[70]，如果在接种的固体培养基上观察到生长或液体培养基检测到阳性信号应发送临时报告。一旦生长明显并完成分枝杆菌鉴定和药敏试验，应签发补充报告。对于MTBC，美国疾病预防控制中心（CDC）指南指出，实验室应在收到标本后21天内发送基于培养的菌种鉴定报告，在MTBC鉴定完成的17天内报告一线药物的药敏结果[70]。为了满足以上要求，液体培养基的使用至关重要。

在医疗机构工作或接受护理的个人感染结核的风险更高。因此，有必要制定一项结核感染控制计划作为总体感染控制计划的一部分，以确保以下方面：①及时识别传染病患者；②预防空气传播；③治疗疑似或确诊的结核病患者。将Cepheid Xpert MTB/RIF检测作为疑似结核病患者是否可以解除隔离的判断依据之一，比使用传统的3个间隔8 h的痰标本抗酸涂片会更快速[82]，这样可以节省医疗资源并改善患者护理[128,129,130]。实验室快速检测和结果报告对此至关重要。

IGRA越来越多地被用于结核感染检测。由于IGRA复杂且影响分析结果的因素较多，制定强有力的质量保证计划尤为重要。应该监控关键的质量保证指标，如阳性结果的百分比、不确定或无效结果的百分比、IGRA值的分布（尤其是那些接近cutoff值的值），以及阳性结果与患者MTBC感染危险因素之间的相关性。在许多实验室，IGRA检测是在血清学实验室中而非结核病实验室进行。实验人员必须与国家结核病规划署、地方公共卫生和感染控制机构、员工健康规划署及医疗保健提供者建立紧密联系，以确定IGRA结果与临床表现、胸部X线检查、其他诊断检查及结核病患者的流行病学危险因素之间的关系。至关重要的是，实验室应针对IGRA的可变性和局限性对临床人员进行培训，以便对IGRA的结果进行合理解释。

越早向公共卫生和结核病控制计划报告可疑结核病例，其传播风险就越小，后续的结核病例也就越少。各地区对公共卫生报告的要求差别很大。临床实验室有责任了解其辖区内结核病报告要求（法规，行政指令和规定）。美国所有50个州和哥伦比亚特区都有关于结核病的报告要求。85%（44/52）的行政区要求报告AFB涂片阳性结果。53%（28/52）的行政区要求在鉴定后24 h内或1个工作日内报告结核培养阳性结果。已发布的临床报告时间范围从立即报告到长达7天或每周不等。23%（12/52）的行政区要求报告基于培养的抗生素药敏试验结果。但是，当前没有辖区要求报告mDST结果。69%（36/52）的行政区要

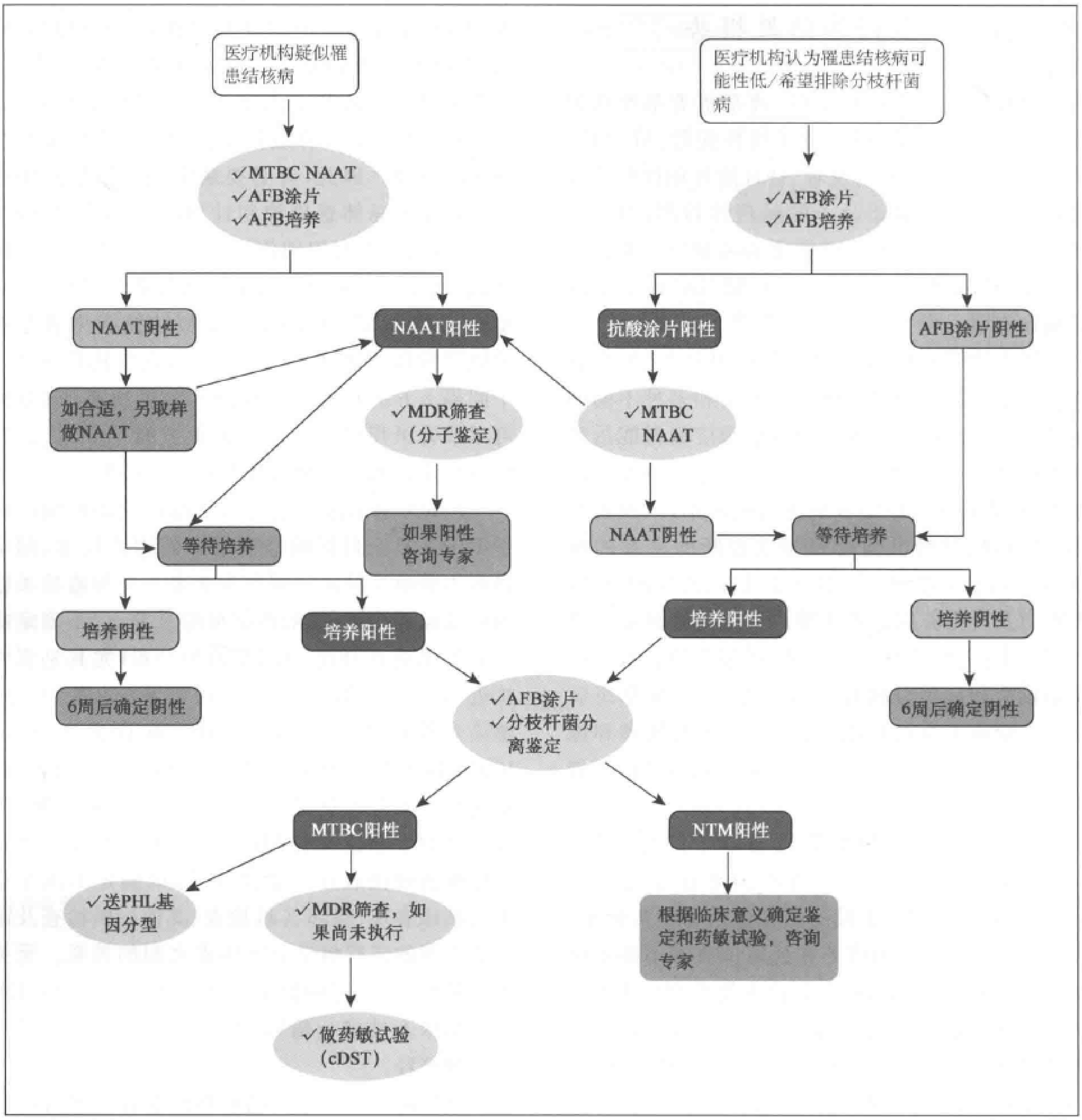


图 32-5 临床和公共卫生实验室分枝杆菌检验理想策略示意图(摘自参考文献[65])

求将每个经培养确认的病例 MTBC 分离株提交给当地或州立公共卫生实验室，以进行确认试验并提交国家基因分型计划。目前有 6 个行政区强制要求电子报告。23%(12/52)的行政区要求报告 LTBI，有些仅要求 5 岁以下儿童要报告。25%(13/52)的行政区要求报告 NTM[131]。

参考文献请扫二维码查阅

第33章　分枝杆菌属：除结核分枝杆菌外慢生长分枝杆菌的实验室特征

ADAM J. CAULFIELD，ELVIRA RICHTER，BARBARA A. BROWN-ELLIOTT，
RICHARD J. WALLACE，JR，NANCY L. WENGENACK

（耿燕　译；赵建宏、刘文恩　审校）

本章将描述慢生长非结核分枝杆菌（slowly growing nontuberculous mycobacteria，SGM）所具有的临床意义。SGM包含了多种重要的人类病原菌，包括但不限于鸟分枝杆菌复合群（*Mycobacterium avium* complex）、堪萨斯分枝杆菌（*M. kansasii*）、嗜血分枝杆菌（*M. haemophilum*）、海分枝杆菌（*M. marinum*）。结核分枝杆菌复合群（*M. tuberculosis* complex，MTBC）也包含许多慢生长分枝杆菌菌种，其对临床微生物学和公共卫生实验室均具有十分重要的意义。因此，本书第32章将专门介绍MTBC，本章不再讨论。

一、分类

Tortoli在2003年提出，分枝杆菌的分类根据鉴定到种水平的方法可分为2个主要的阶段[1]：第一阶段，以表型研究为特征，从19世纪80年代末到20世纪80年代末；第二阶段更重要，以向基因型研究的转变为特点，从20世纪后十年开始一直持续到现在。

目前在已知的180多种非结核分枝杆菌（nontuberculous mycobacteria，NTM）中，大约有90种为慢生长分枝杆菌[2]（表33-1）。其中，在临床上具有重要意义的SGM包括鸟分枝杆菌（*Mycobacterium avium*）、胞内分枝杆菌（*M. intracellulare*）、堪萨斯分枝杆菌（*M. kansasii*）、海分枝杆菌（*M. marinum*）、蟾分枝杆菌（*M. xenopi*）、玛尔摩分枝杆菌（*M. malmoense*）、嗜血分枝杆菌（*M. haemophilum*）和溃疡分枝杆菌（*M. ulcerans*）。戈登分枝杆菌（*M. gordonae*）虽为罕见病原菌，却经常出现在人群样本中，通常是自来水污染的结果。

与快生长分枝杆菌（rapidly growing mycobacteria，RGM）一样（第34章），大多数对SGM的描述都始于20世纪90年代早期，伴随着分子生物学技术的出现。鸟分枝杆菌复合群是临床标本中最常分离出的SGM菌种。此复合群由11个菌种组成，前10个分别为鸟分枝杆菌（*M. avium*）、胞内分枝杆菌（*M. intracellulare*）、奇美拉分枝杆菌（*M. chimaera*）、奥尔胡斯分枝杆菌（*M. arosiense*）、哥伦比亚分枝杆菌（*M. colombiense*）、伤口分枝杆菌（*M. vulneris*）、马萨分枝杆菌（*M. marseillense*）、罗讷河口分枝杆菌（*M. bouchedurhonense*）、蒂莫内分枝杆菌（*M. timonense*）和莲建分枝杆菌（*M. yongonense*）。从本书上一版本开始，副胞内分枝杆菌（*M. paraintracellulare*）被描述为该复合群的第11个菌种。此外，还描述了4种鸟分枝杆菌（*M. avium*）的亚种，其中包括鸟分枝杆菌鸟亚种（*M. avium* subsp. *avium*）、鸟分枝杆菌副结核亚种（*M. avium* subsp. *paratuberculosis*）、鸟分枝杆菌森林亚种（*M. avium* subsp. *silvaticum*）和鸟分枝杆菌人猪亚种（*M. avium* subsp. *hominissuis*）。

2007—2015年，报道了从人类临床标本中分离出的约25个新的SGM，其中包括欧洲分枝杆菌（*M. europaeum*）、韩国分枝杆菌（*M. koreense*）、伦巴第分枝杆菌（*M. longobardum*）、明尼苏达分枝杆菌（*M. minnesotense*）、副韩国分枝杆菌（*M. parakoreense*）、雪利分枝杆菌（*M.

sherrisii)、新宿分枝杆菌(*M. shinjukuense*)、英格贝克分枝杆菌(*M. engbaekii*)、赫拉克利翁分枝杆菌(*M. heraklionense*)和莲建分枝杆菌(*M. yongonense*)。自本书的上一版以来,从人类标本中分离出的另外6种SGM得到了官方认可,其中包括阿尔斯分枝杆菌(*M. alsense*)[3]、帕拉分枝杆菌(*M. paraense*)[4]、副胞内分枝杆菌(*M. paraintracellulare*)[5]、波斯分枝杆菌(*M. persicum*)[6]、塔尔蒙分枝杆菌(*M. talmoniae*)[7]和弗吉尼亚分枝杆菌(*M. virginiense*)[8]。

二、流行病学与传播

不像结核分枝杆菌,人类是其确定性宿主及唯一的自然宿主,大多数NTM广泛分布于自然环境中。SGM肺部疾病发生主要与宿主危险因素有关,如年龄、体重、慢性肺部疾病史(如囊性纤维化、支气管扩张或慢性阻塞性肺疾病等)、胸部结构的改变及其他与暴露相关的因素。NTM可在土壤和水样本(包括天然的和处理过的水)中找到。例如,鸟分枝杆菌(*M. avium*)、堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*)、慢生黄分枝杆菌(*M. lentiflavum*)、猿分枝杆菌(*M. simiae*)和蟾分枝杆菌(*M. xenopi*)通常可以在市政供水中发现,而很少在其他环境资源中找到。

另外,与MTBC不同,目前尚无研究证据表明SGM存在动物到人(除了来自鱼或鱼缸的海分枝杆菌)或人到人的传播。现在认为人类可通过吸入含致病菌的气溶胶、创伤性植入或间接摄入被污染的食物或水等途径从环境中感染非结核分枝杆菌。并不一定总能从感染的源头检测到SGM[9]。

表33-1 目前公认的SGM菌种的特征[a,b]

菌种	色素沉着	致病性	描述时间
阿尔及利亚分枝杆菌	N	Y[c]	2011
阿尔斯分枝杆菌	Y	Y	2016
神仙鱼分枝杆菌	N	Y[d]	2015
奥尔胡斯分枝杆菌	Y	Y	2008
阿罗普分枝杆菌	N[e]	Y	2006
亚洲分枝杆菌	Y	Y	1971
鸟分枝杆菌鸟亚种	N[e]	Y[f]	1901
鸟分枝杆菌人猪亚种	N[e]	Y[g]	2002
鸟分枝杆菌副结核亚种	N[e]	Y	1990
鸟分枝杆菌森林亚种	N[e]	Y[h]	1990
波西米亚分枝杆菌	Y	Y	1998
波特尼分枝杆菌	Y	N	2000
罗讷河口分枝杆菌	N	Y	2009
布兰德分枝杆菌	N	Y	1995
隐蔽分枝杆菌	N	Y	1993
奇美拉分枝杆菌	N	Y	2004
哥伦比亚分枝杆菌	Y	Y	2006
出众分枝杆菌	Y	Y	1996
库克分枝杆菌	Y	N	1990
多瑞卡分枝杆菌	Y	Y	2001
英格贝克分枝杆菌	Y[i]	U	2013
欧洲分枝杆菌	Y	Y	2011
产鼻疽分枝杆菌	Y	Q	1973
佛罗伦萨分枝杆菌	N	Y	2005
弗拉加分枝杆菌	N	U	2013
胃分枝杆菌	N	N	1966
日内瓦分枝杆菌	N	Y	1993
戈登分枝杆菌	Y	N	1962
嗜血分枝杆菌	N	Y	1978
黑克肖分枝杆菌	Y	Y	2001

（续　表）

菌种	色素沉着	致病性	描述时间
海德堡分枝杆菌	N	Y	1998
赫拉克利翁分枝杆菌	N	Y	2013
爱尔兰分枝杆菌	Y[i]	N	1993
居间分枝杆菌	Y	Y	1993
中间分枝杆菌	Y	Q	1993
胞内分枝杆菌	Y/N	Y	1965
堪萨斯分枝杆菌	Y	Y	1955
韩国分枝杆菌	N	U	2012
库比卡分枝杆菌	Y	N	2000
熊本分枝杆菌	U	Y	2006
杏林分枝杆菌	N	Q	2009
湖分枝杆菌	N	Q	2002
慢生黄分枝杆菌	Y	Y	1996
麻风分枝杆菌	—	Y	1880
鼠麻风分枝杆菌	—	Y	1912
伦巴第分枝杆菌	N	Y	2013
玛尔摩分枝杆菌	N	Y	1977
曼藤分枝杆菌	Y	Y	2009
海分枝杆菌	Y	Y	1926
马萨分枝杆菌	N	Y	2009
明尼苏达分枝杆菌	Y	N	2013
蒙蒂菲奥里分枝杆菌	N	Y[j]	2003
内布拉斯加分枝杆菌	Y	Q	2004
不产色分枝杆菌	N	N	1965
奈梅亨分枝杆菌	N	N	2009
沼泽分枝杆菌	Y	Q	2002
帕拉分枝杆菌	Y/N	Y	2015
石蜡分枝杆菌	Y	U	2009
副戈登分枝杆菌	Y	N	2014
副胞内分枝杆菌	Y/N	Y	2016
副韩国分枝杆菌	N	U	2012
副瘰疬分枝杆菌	Y	Y	2004
副首尔分枝杆菌	Y	U	2010
副土分枝杆菌	Y	Y	2010
帕尔玛分枝杆菌	Y	Y	2004
波斯分枝杆菌	Y	U	2017
假肖茨分枝杆菌	Y	Y[d]	2005
灰尘分枝杆菌	N	N	1983
利雅得分枝杆菌	N	Y	2009
莎斯喀彻温分枝杆菌	Y	Y	2004
瘰疬分枝杆菌	Y	Y	1956
首尔大学分枝杆菌	N	Q	2008
首尔分枝杆菌	Y	Q	2007
雪利分枝杆菌	N	Y	2011
志贺分枝杆菌	Y	Y	2011
下出分枝杆菌	N	Y	1982
新宿分枝杆菌	N	Y	2011
肖茨分枝杆菌	N	Y[d]	2003
猿分枝杆菌	Y	Y	1965
丽鱼分枝杆菌	N	Y[d]	2008
苏尔加分枝杆菌	Y	Y	1972
塔尔蒙分枝杆菌	N	U	2017
土分枝杆菌	N	Q	1966

（续 表）

菌种	色素沉着	致病性	描述时间
蒂莫内分枝杆菌	N	Y	2009
三重分枝杆菌	N	Y	1997
次要分枝杆菌	N	N	1970
托斯卡纳分枝杆菌	Y	Y	1999
溃疡分枝杆菌	N	Y	1950
弗吉尼亚分枝杆菌	N	Y	2016
伤口分枝杆菌	Y	Q	2009
蟾分枝杆菌	N	Y	1959
莲建洞分枝杆菌	N	Y	2013

注：[a] 引号中的菌种是未验证菌种。[b] Y. 是；N. 否；U. 不确定；Q. 有疑问的；—. 在人工培养基上不生长。[c] 山羊。[d] 鱼。[e] 少数菌株可能表现出光产色性。[f] 人和鸟。[g] 人和猪。[h] 鸟。[i] 一些菌株产粉红色色素。[j] 鳗鱼

与结核病（tuberculosis，TB）不同，由于 NTM 不存在人到人之间的传播，所以其感染的人数并不需要上报公共卫生机构，故只能估算 NTM 感染的发病率。2007 年的一篇文献报道，在加拿大安大略省的肺部疾病中，所有 NTM（不含戈登分枝杆菌）的分离率已经从 1997 年的 9.1/10 万增加到 2003 年的 14.1/10 万，平均年增长率为 8.4%。同样，在个别菌种所致疾病中，也有发病率增加的类似报道。这些发现表明，在加拿大由 NTM 导致的肺部疾病明显升高[10]。一些欧洲国家也报道了 NTM 分离菌株数量日益增多[11]。尽管相关数据还不多，但是在美国也有人以为 NTM 疾病的患病率将会上升。最近一项有关俄勒冈居民报告的非呼吸性 NTM 分离株的临床和微生物学数据的研究，采用美国胸科协会（America Thoracic Society，ATS）和美国感染性疾病协会（Infectious Diseases Society of America，IDSA）确定的 NTM 感染的诊断标准，结果发现，在全体人群中，NTM 感染的发生率为 8.6/10 万，而在 50 岁以上的人群中，其发病率则为 20.4/10 万[12]。

SGM 感染最常见的是在肺部，也可以出现皮肤、软组织、淋巴结和播散型感染。播散型感染通常发生在晚期 HIV 感染人群中。当然，非 HIV 感染患者也可能受到感染。虽然不同地区分离出的菌种类型有所不同，但是鸟分枝杆菌复合群（*Mycobacterium avium* complex，MAC）菌株仍然是最常见的致病性 SGM，许多其他的 SGM 也可引起疾病。在美国，堪萨斯分枝杆菌是位居第二的肺部 SGM 致病性菌[9]。

近年来，医院环境污染及心脏旁路手术后奇美拉分枝杆菌（*Mycobacterium chimaera*）获得性感染已经成为一种公共卫生的危机。在欧美的报道中，将此菌种与心肺转流术中用于体外循环的加热-冷却装置的污染相关联[13-14]。虽然装置内被污染的水并不直接接触病人的血液，但是装置内的马达冷却风扇会雾化水中的微生物，从而使微生物从机器中播散至无菌手术区域。自 2013 年以来，已有超过 100 例的奇美拉分枝杆菌感染与受到污染的加热制冷装置相关，典型表现为术后 1～4 年出现的人工瓣膜心内膜炎、血管移植物感染或合并分枝杆菌菌血症的播散性疾病[15]。

三、临床意义

由于大多数 SGM 菌种存在于自然环境中且为条件致病菌，故对临床分离出来的 SGM 菌株需要综合多种因素以确定其临床意义，包括临床情况、宿主特定因素、菌株、微生物的致病性、培养阳性的数量、培养分离株的来源、经涂片和培养检测到的微生物的数量[9]。例如，特定的 SGM 如戈登分枝杆菌在痰培养中阳性率很高，但是它的致病性非常低。相比之下，引起呼吸系统疾病的 SGM 菌种如鸟分枝杆菌复合群（*Mycobacterium avium* complex，MAC）和堪萨斯分枝杆菌（*M. kansasii*），以及引起皮肤疾病的菌种如嗜血分枝杆菌（*M. haemophilum*）、海分枝杆菌（*M. marinum*）和溃疡分枝杆菌（*M. ulcerans*），通常是临床上重要的病原菌。临床医生对于新描述的 SGM 临床意义的理解，将会随着更多描述与这些菌种感染相关的临床特征文献的发表而逐渐深入。下文会对几种 SGM 临床意义进行简要概述。表 33-2 提供有临床意义的主要几种 SGM 所引起临床表现的相关信息。

表 33-2 特定 SGM 菌种的重要特性[a]

菌群和菌种	最适生长温度(℃)	菌落形态	烟酸试验	硝酸盐还原试验	16S rRNA 基因特征[GenBank 登号和(或)编号]	临床相关性[b]，首次分离出该菌株的标本，或者重要的实验室特征(编号)
常见的 MAC 亚种						
鸟分枝杆菌鸟亚种，鸟分枝杆菌副结核亚种，鸟分枝杆菌森林亚种	30～37	光滑(粗糙)	阴性	阴性	3 种已确认的亚种[81]，另一种提出的亚种("鸟分枝杆菌人猪亚种")[72]；所有亚种的 16S rRNA 基因序列相同(GQ153272)	儿童淋巴结炎，成人肺部疾病[b]，HIV 患者常出现播散性感染。鸟分枝杆菌副结核亚种可引起牛的约翰病，并且可能与人的克罗恩病相关
胞内分枝杆菌	30～37	光滑(粗糙)	阴性	阴性	已出现一些序列变异体，一些已提高到种水平(见下面几行)(GQ153276)	成人肺部疾病[b]，HIV 患者较少出现播散性感染
其他 MAC 成员						
奥尔胡斯分枝杆菌	42	光滑	ND	阳性	与胞内分枝杆菌有 6 bp 差别(EF054881)	儿童骨髓炎[82]c
奇美拉分枝杆菌	25～37	光滑	阴性	阴性	与胞内分枝杆菌有 1 bp(403 位)差别(AJ548480)	与胞内分枝杆菌非常相似[83]d，与加热-冷却装置相关，是心脏手术后引起胸骨伤口感染和播散性疾病的原因。此分枝杆菌多存在于环境标本中
哥伦比亚分枝杆菌	20～37	粗糙	阴性	阴性(85%)	与胞内分枝杆菌有 7 bp 差别(AM062764)	HIV 患者，血液，痰[84]e
伤口分枝杆菌	37	光滑	阴性	阴性	与哥伦比亚分枝杆菌(*M. colombiense*)有 3 bp 差别(EU834055)	儿童淋巴结炎和被犬咬伤后的感染[85]c
其他的 SGM						
波西米亚分枝杆菌	37～40	光滑	阴性	阴性	独特的 16S rRNA 基因序列[86](U84502)	儿童淋巴结炎[87]
隐蔽分枝杆菌	33～42	光滑	阴性	阴性	发表了 3 种序列类型，2 型与 1 型不同，3 型与 1 型相似[88,89]；不明确分类情况；拥有 2 个 rRNA 操纵子[90](L08169，1 型；L08170，2 型；Z46664，3 型)	成人肺部疾病[b]
日内瓦分枝杆菌	31～42	光滑	阴性	阴性	独特的 16S rRNA 基因序列[91](X60070)	最早在 HIV 患者标本中检测到，也可来自非免疫低下患者。生长极其缓慢(>6 周)，在固体培养基上几乎不生长，液体培养基上生长不良(scarce growth)，加入分枝菌素 J 可促进其生长。是鹦鹉最常见的分枝杆菌病
戈登分枝杆菌	30～37	光滑/粗糙	阴性	阴性	一些 16S rRNA 基因的序列变异体[34](AJ581472)；序列变异体(FJ418069[f]，EU486080，GUI42930)；ATCC 14770[T] 序列的 1461 bp(X52923)	存在于自来水系统中，一般没有临床意义

（续 表）

菌群和菌种	最适生长温度(℃)	菌落形态	烟酸试验	硝酸盐还原试验	16S rRNA 基因特征[GenBank 登号和(或)编号]	临床相关性[b]，首次分离出该菌株的标本，或者重要的实验室特征(编号)
嗜血分枝杆菌	28～30	粗糙	阴性	变异[g]	独特的 16S rRNA 基因序列(X88923)	儿童淋巴结炎；免疫抑制患者包括皮肤损伤的播散性疾病；分离培养一般需要在培养基中加入氯化血红素
海德堡分枝杆菌	30～37	光滑	阴性	阴性	独特的 16S rRNA 基因序列(X70960)	儿童淋巴结炎[92]
爱尔兰分枝杆菌	37	粗糙	ND	阳性	独特的 16S rRNA 基因序列[与英格贝克分枝杆菌(*M. engbaeckii*)有 1 bp 的差别](AY438069[f])；ATCC 49874[T] 序列的 1419 bp(X67096)	从环境样本中分离出该菌，一般无临床意义
居间分枝杆菌	31～37	光滑	阴性	阴性	独特的 16S rRNA 基因序列(X70961)	儿童淋巴结炎[93]
中间分枝杆菌	31～37	光滑	阴性	阴性	独特的 16S rRNA 基因序列(X67847)	从痰标本中分离出该菌[94]
堪萨斯分枝杆菌	35～37	粗糙	阴性	阳性	6 个亚种存在几个基因的差别[35,71]；亚种 1 在全球范围流行[72,95,96](AF480601)	成人肺部疾病[b]；很少引起儿童淋巴结炎
慢生黄分枝杆菌	22～37	光滑	阴性	阴性	3 种序列变异体(X80769，X80770，X93995)	大多数分离菌来自肺部标本[36]b
玛尔摩分枝杆菌	30	光滑	阴性	阴性	独特的 16S rRNA 基因序列，与苏尔加分枝杆菌(*M. szulgai*)的序列非常相似(GQ 153278)，ATCC 29571[T] 序列的 1463 bp(X52930)和 1495 bp 的 ATCC 29571[T](GQ15328)	儿童淋巴结炎；成人肺部疾病[b]；该菌种在美国罕见，但北欧国家常见
海分枝杆菌	30	粗糙(光滑)	变异[g]	阴性	与溃疡分枝杆菌 16S rRNA 基因序列仅有 2 bp 的差别[97](AJ 536032)	游泳池肉芽肿；生长速度有差别；溃疡分枝杆菌生长极其缓慢(>6 周)；海分枝杆菌≥7 天(中间增长)
瘰疬分枝杆菌	37	光滑	阴性	阴性	独特的 16S rRNA 序列(GQ153271)	之前与儿童淋巴结炎相关
下出分枝杆菌	37	粗糙	阴性	阴性	独特的 16S rRNA 序列(没有正确可用的序列)	
猿分枝杆菌	37	光滑	变异	阳性	独特的 16S rRNA 序列(GQ153280)	成人肺部疾病[b]；也可依地理位置出现在供应水中
苏尔加分枝杆菌	37	粗糙/光滑	阴性	阳性	独特的 16S rRN A 基因序列，但是其与玛尔摩分枝杆菌的序列非常相似(AF547969e)；也与神仙鱼分枝杆菌序列相同；ATCC 35799[T] 序列的 1462 bp(X52926)和(KC951278)	成人肺部疾病[b]

（续　表）

菌群和菌种	最适生长温度(℃)	菌落形态	烟酸试验	硝酸盐还原试验	16S rRNA 基因特征[GenBank 登号和(或)编号]	临床相关性[b]，首次分离出该菌株的标本，或者重要的实验室特征(编号)
土分枝杆菌复合群（其他具有临床意义的菌种包括阿罗普分枝杆菌、赫拉克利翁分枝杆菌、熊本分枝杆菌、弗吉尼亚分枝杆菌）	25～37	粗糙/光滑	阴性	阳性/阴性	本组菌种具有相同的表型特征和临床意义，菌种鉴定需要 16S rRNA 基因测序	通常为手或手指的腱鞘炎/骨髓炎，其他来源(即痰)的分离菌株通常无临床意义。最常见的菌种是阿罗普分枝杆菌（阿罗普分枝杆菌，DQ157760；赫拉克利翁分枝杆菌，GU084182；熊本分枝杆菌，AB239925；土分枝杆菌，DQ058407；弗吉尼亚分枝杆菌，KR025879)，基于 100％16S rRNA 基因序列的鉴定结果表明，不产色分枝杆菌尚未被报道为病原菌
溃疡分枝杆菌	30	粗糙	阴性	阴性	与海分枝杆菌的 16S rRNA 基因序列仅有 2 bp 的差别(核苷酸 1248 和 1289)[97]（没有可用的正确序列）	在热带环境中广泛的皮肤溃疡；在人工培养基上需要长时间孵育(＞6 周)；海分枝杆菌在 30℃生长≥7 天
蟾分枝杆菌	40～45	光滑	阴性	阴性	独特的 16S rRNA 基因序列[AJ536033（在 182 位和 408 位可能存在 C 或 T)]	存在于热水系统中；通常无临床意义；很少引起慢性肺部疾病

注：[a] ND. 不确定；Var. 变异。[b] 肺部标本的临床意义必须根据美国胸科协会或美国感染性疾病协会指南来证明。[c] AccuProbe 检测时用 MAC-和胞内分枝杆菌特异性探针为阳性结果，而用鸟分枝杆菌特异性探针则是阴性结果。[d] AccuProbe 检测时用 MAC-特异性探针为阳性结果，而用鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌特异性探针则是阴性结果。[e] AccuProbe 法没有可用的数据。[f] 不同报道的数据不一致。[g] 参见文献[98]，该检测方法与目前的条带法不同

SGM 中最常见的菌群是 MAC。MAC 是由若干个密切相关的菌种及在上面“分类”中详细介绍的亚种组成。MAC(尤其是鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌)经常引起慢性呼吸系统疾病，常见的宿主为中年男性吸烟者和患有支气管扩张的绝经后女性(“温德米尔夫人综合征”)。其他表现包括淋巴结炎(通常是单侧)、腱鞘炎和播散性疾病，后者常在晚期 HIV 感染的患者中出现。值得注意的是，MAC 作为环境型菌种经常出现于饮用水源、土壤、植物和动物中。它们还是肺部的共生菌，故从呼吸道分离出菌种是否具有意义，还需要结合临床。美国感染性疾病协会和美国胸科协会为帮助确认呼吸源性 MAC 分离株的临床意义提供了指导方法[9]。

日内瓦分枝杆菌(*M. genavense*)是对培养条件要求较高的 SGM，需要在培养基中添加分枝杆菌素 J(一种铁的螯合剂)，并将孵育时间延长至 12 周才能在培养基中生长。尽管在其他免疫缺陷的患者中也有病例报道，但是它与患有 AIDS 的免疫功能低下的宿主有典型的相关性。它还会引起鹦鹉和长尾鹦鹉等鸟类疾病。

戈登分枝杆菌也被称为自来水杆菌，是实验室最常见的分枝杆菌之一，但是其通常被视为一种污染菌或者非病原菌。它是一种在土壤和水源中发现的暗产色菌，很少与人类疾病相关。除非能够从标本中重复地分离出，并且具有良好的临床相关性，本菌种才能被认为是一种病原菌。因此，很少对戈登分枝杆菌分离株进行常规的药敏试验[16]。

嗜血分枝杆菌是一种对培养条件要求较高的 SGM，需要在低温(28～30℃)环境下孵育，在添加有含铁化合物[如柠檬酸铁铵或氯化血红素(Ⅹ因子)]的培养基中生长。嗜血分枝杆菌通常是从免疫功能低下的宿主，尤其是艾滋病患者中分离出来，并且经常表现为四肢上的多个皮肤结节。它也是引起其他健康的儿科患者颈淋巴结肿大的原因。

堪萨斯分枝杆菌通常存在于自来水和其他

水源中，并且会引起类似于结核病的慢性肺部疾病。其还会引起皮肤和软组织感染、颈淋巴结肿大、腱鞘炎、心包炎，很少引起播散性疾病，通常发生在免疫功能缺陷的宿主身上。堪萨斯分枝杆菌是具有 16S rRNA 基因序列的光照产色菌种与非光照产色菌种胃分枝杆菌(*M. gastri*)密切相关[17]。

海分枝杆菌感染俗称鱼缸分枝杆菌，因为经常在创伤皮肤暴露于淡水或盐水后而出现感染，如在鱼缸或沿海地区发现该细菌。典型的临床表现为单个丘疹，病变通常局限于四肢(手指、肘、足、膝等)。病变通常会在细菌进入伤口后 2～3 周出现，并且随着时间的推移，伤口可能会出现溃烂。类似于皮肤孢子丝菌病，海分枝杆菌感染可能会沿着淋巴系统扩散，引起严重的并发症，如腱鞘炎、骨髓炎和弥漫性感染。海分枝杆菌作为一种光照产色菌所需的最适培养温度较低(28～30℃)。

猿分枝杆菌(*M. simiae*)是另一种与慢性呼吸道疾病相关的 SGM。由于其对包括利福布汀在内的多数一线抗结核药存在耐药性，故通常极难治疗，且与发病率和病死率显著相关。

土分枝杆菌复合群(*M. terrae* complex)传统上被视为环境的共生 SGM。但是随着分子技术的出现，本复合群中，包括阿罗普分枝杆菌(*M. arupense*)、熊本分枝杆菌(*M. kumamotonense*)、赫拉克利翁分枝杆菌(*M. heraklionense*)和弗吉尼亚分枝杆菌(*M. virginiense*)，已经被视为与腱鞘炎或骨髓炎相关的病原菌。相反，本复合群中曾经(分子鉴别技术之前)被认为具有致病性的菌种，如土分枝杆菌(*M. terrae*)和不产色分枝杆菌(*M. nonchromogenicum*)，现在已知很少致病[8,18]。

溃疡分枝杆菌仅次于结核分枝杆菌复合群和麻风分枝杆菌(*M. leprae*)，是引起全球性分枝杆菌病的第三大常见原因。溃疡分枝杆菌的感染在非洲被称为布鲁里溃疡病，在澳大利亚被称为拜恩斯代尔溃疡病。菌体通过外伤植入四肢(足、腿、手等)后，引起无痛性结节或肿块。随着时间的推移，结节开始出现溃烂，并且最终导致广泛溃疡性坏死或骨髓炎而引起疼痛、毁容甚至失去患肢。溃疡分枝杆菌引起的组织损伤，主要是由其产生的一种毒性分枝杆菌内脂(mycolactone)所引起[19]。因为溃疡分枝杆菌对于培养条件要求较高的特征，导致其难以在分枝杆菌中培养基中生长。溃疡分枝杆菌在培养基中生长，需要较低的温度(28～30℃)与更长的培养时间(最长 3 个月)。分子技术的发展使人们提高了对于这种培养环境要求较高的 SGM 的检测水平[20]。

蟾分枝杆菌(*M. xenopi*)是于 1957 年首次从非洲蟾蜍(非洲爪蟾)的皮肤病损中被分离出来，但是其现在被视为引起人类慢性呼吸系统疾病、皮肤和软组织感染、化脓性关节炎及主要出现在免疫功能低下的宿主中的播散性疾病的病原菌，蟾分枝杆菌的生长需要较高温度(约 45℃)，并且经常可以从热水系统和水槽中被分离出来。

四、直接检测方法

(一)显微镜检查

显微镜检查一直是检测临床样本中是否存在分枝杆菌的最早期、最简易、最廉价的方法之一。由于分枝杆菌细胞壁的疏水作用，阻止了染色剂的浸润，导致常规的革兰染色不能很好地让分枝杆菌着色，因此临床上采用特殊的抗酸染色方法，并结合明视野和荧光显微镜进行分枝杆菌的染色镜检。对于该方法的深入讨论见本书第 31 章。

(二)抗原、抗体和 γ 干扰素的检测

临床实验室抗原检测一般不用于 SGM 的直接检测。目前没有针对 SGM 菌种免疫诊断的商用检测试剂盒。但是堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌和苏尔加分枝杆菌(*M. szulgai*)与用来诊断潜在结核菌感染的血清学试验试验(γ 干扰素释放试验)之间，可能存在非特异性交叉反应[21]。

(三)直接检测核酸

对于某些菌种，如鸟分枝杆菌复合群和溃疡分枝杆菌，已经报道了通过 PCR 技术直接检测临床标本中的核酸。但是它们目前仅用于实验室开发测试而不是商业化试验，故通常只用于研究或公共卫生实验室而不用于临床诊断实验室中[20,22]。这些测定通常会对 16S rRNA 基因、16S～23S 的内部转录间隔区(ITS)或热激蛋白 65 基因(*hsp*65)的内部区域进行扩增。AnyPlex MTB/NTM 实时检测方法(Seegene，韩国首尔)是

一种商用多重实时 PCR 技术，它是一项可以使用单荧光通道同时筛选和检测多个靶点的专利技术。该技术已被用于区分直接取自临床标本的 NTM 和 MTBC。有研究表明，在检测 NTM 时，该技术与 110 个主要呼吸道临床标本培养结果做对比，其敏感性达到 100%，特异性达到 97%。但是在美国目前还没有应用[23]。线性探针法[the GenoType CMdirect（Hain Lifescience，Nehren，Germany）]可以从去污染的痰标本（decontaminated sputum specimens）中检测 MTBC 和 20 种临床相关 NTM 菌种。

(四)麻风分枝杆菌 PCR

麻风分枝杆菌是一种不可培养的微生物。PCR 技术已经开发并应用于多种来源标本的检测，如皮肤裂口涂片、血液、鼻腔分泌物、活检标本和尿[24]。通过 PCR 技术检测的麻风分枝杆菌的分子靶标，包括编码 18 kDa 和 36 kDa 蛋白抗原的基因（称为富含脯氨酸的抗原）、编码 65 kDa 和 85 kDa 抗原的基因、16S rRNA 基因和重复序列[24-25]。许多研究表明，PCR 技术在诊断麻风分枝杆菌方面比常规方法（皮肤裂口涂片、组织病理学和血清学）具有更高的敏感性和特异性[24]。

五、鉴定

NTM 的快速检测和鉴定一直是临床分枝杆菌实验室的一项重要任务。在过去的 30 年里，基于与传统生化和形态特征相比的测序鉴定的进展，已经确认的 NTM 种类已由 30 种增加到约 180 种，这一变化趋势与 NTM 感染发病率的提高平行。分子生物学技术的应用能显著加速诊断过程。从历史上看，除少数例外情况，分枝杆菌菌种的鉴定要依靠一系列限于专业实验室才能完成的表型检测分析，且这些检测一般需要足够的细菌量和数周时间的培养。而现在普遍认为大多数分枝杆菌通过生化和表型检测方法来鉴定并不可靠，最终的鉴定需要应用分子技术。一些菌种可能出现趋同特性，一个种属的不同菌株在某些特征上可能表现出差异性。此外，许多遗传鉴定的新菌种尚未通过生化和表型方法进行详细研究。因此，现在用于分枝杆菌菌种鉴定最可靠的方法是对特定基因的分子检测。这些技术的另一优势在于可以对液体培养的分枝杆菌进行检测。一般而言，与固体培养基相比，在液体培养基中分枝杆菌生长更快，检测也更加敏感。NTM 的混合培养并不少见[26]，仅用肉汤培养可能存在风险，因此，经分子技术得到的结果应通过表型特征进行确认，如生长速度、菌落形态和色素形成等（表 33-2），并且还要确认固体培养基 NTM 分离株的纯度。分子结果的报告不应因表型相关性和纯度确认而延迟，但应调查任何基因型或表型差异，并在必要时发布修订报告。

用于鉴定在培养基上生长的选定 SGM 菌种[MAC（鸟分枝杆菌复合群和细胞内分枝杆菌）、戈登分枝杆菌和堪萨斯分枝杆菌]的 DNA 探针已有多年历史。不是所有实验室都有足够的资金、设备和仪器来进行分枝杆菌的分子检测。如果没有分子鉴定技术，实验室应将 SGM 分离株转交给具有 DNA 测序或基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry，MALDI-TOF MS）技术能力的参考实验室，以进行准确鉴定[17]。

(一)表型检测方法

目前的指南推荐分枝杆菌的培养至少使用 2 种不同的培养基。尽管液体培养基（通常选用 Middlebrook 7H9 或 7H12）能快速检测分枝杆菌的生长，而表型鉴定则要求分枝杆菌生长在鸡蛋或琼脂的固体培养基上。一般而言，分枝杆菌在液体肉汤中快速生长及后续分子鉴定可明确鉴定菌种。如上所述，必须注意确保液体肉汤只含单一微生物而非多种细菌的混合培养物。因此，表型分析最主要应用是为了补充或证实分子鉴定的结果，有时分子鉴定的结果也模棱两可。

分枝杆菌表型分类的关键特征是生长速率、最适生长温度、形态和色素形成情况。而生化反应基本上不用，其在现代分枝杆菌检测实验室的应用已逐渐被淘汰。

(二)生长速率

分枝杆菌生长速率是一种能够被直接观察到的明显属性。分枝杆菌的生长速率受温度、最初的细菌接种量和菌种类型的影响。尽管采用标准化生长曲线的液体培养方法已经开发出来

(Bactec MGIT system 和 Versa TREK system)，但评价生长速率的最可靠的方法是在固体培养基上进行。在常规实验室进行标准化生长实验时，可将定量的分枝杆菌悬液（如 0.5 麦氏标准单位）接种于固体培养基上，置（30±1）℃和（36±1）℃孵育，第 5～7 天观察培养情况，此后每周如此。分枝杆菌可分为慢生长和快生长分枝杆菌，快生长分枝杆菌可在培养 7 天内形成成熟菌落，而慢生长分枝杆菌菌落形成则需要更长的孵育时间。

(三)温度

分枝杆菌属的细菌在一定温度下的生长能力不同。为了确定最适生长温度，可将定量分枝杆菌悬液（如 0.5 麦氏标准单位）接种于固体培养基上，置于（30±1）℃和（36±1）℃的不同的温度条件下孵育。大多数的慢生长分枝杆菌在 35～37℃生长良好，但有一些细菌包括海分枝杆菌则在较低温度（30℃）生长更好，尤其是初次分离时。因此，当样本量允许时，对于来自皮肤或淋巴结以及身体外周的其他组织样本，应当常规同时在（30±1）℃和（36±1）℃条件下培养。特殊培养基（如含有 X 因子的嗜血分枝杆菌培养基）并于较低或者较高温度下孵育，对于有些菌种的最佳生长是十分必要的，如嗜血分枝杆菌（28～32℃）、蟾分枝杆菌（42℃）、出众分枝杆菌（*M. conspicuum*）（22～31℃）和丽鱼分枝杆菌（*M. stomatepiae*）（22℃）。对于最适生长温度的确定，已知的快生长分枝杆菌 1 周内即可读取，而慢生长分枝杆菌则需要更长时间的培养。

(四)菌落形态

菌落形态是分枝杆菌一种很容易确定的表型属性。形态特征如大小、菌落的描述（扁平、凸起等）都应当记录下来，但光滑型还是粗糙型菌落最具鉴别意义。当使用不同配方的固体培养基时，菌落的形态也可能不同。单独的 SGM 菌种的菌落形态也可能表现出光滑型或粗糙型，所以单独使用菌落形态学作为参数来区分菌种是不可靠的。最新研究表明，在 RGM 中菌落的生长形态可能与致病性有关，具有粗糙的菌落形态就代表更具侵袭性表型。但是在 SGM 中，尚未做相关研究。

(五)色素形成和光反应性

分枝杆菌色素的形成已经被当作一种主要的分类方法，用来区分不产色型和产色型分枝杆菌（Runyon 分类系统）。NTM 可产生色素（暗产色或光产色）或不产色素。产色素的 NTM 产生的色素可从淡黄色转变为橙色甚至玫瑰色。在产色素的分枝杆菌中，光产色型在暗处不显色，只有在光照以后才能产生色素（图 33-1）。由于产色过程是一种需氧反应，如果培养管是盖紧密封的，初始培养的产色分枝杆菌即使在光照下也无色素形成。而在生物安全柜中将培养瓶瓶盖拧松，将有助于促进菌落颜色变化。暗产色分枝杆菌无论长在暗处或光照下均能产生色素（图 33-2）。随着培养时间的增加，菌落颜色可能会加深。不产色分枝杆菌在暗处和光照后均不能产生色素。该菌菌落的颜色可能保持灰白色、浅黄色或者淡黄色，并且在光照下颜色不会增加（图 33-3）。

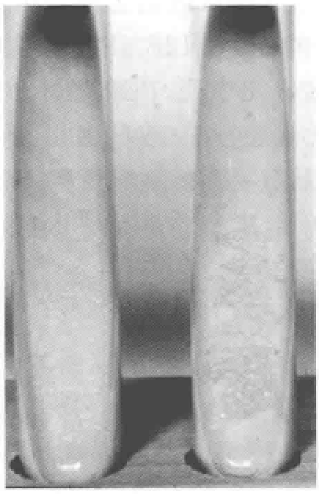


图 33-1 Lowenstein-Jensen 斜面上生长 2 周的海分枝杆菌。左为光照之前形态，右为光照之后的形态（光产色性），见彩插

六、SGM 菌种的鉴定

SGM 的表型鉴定已经不能够满足菌种水平的鉴定需要。因此，分子生物学技术已经成为鉴定的金标准。实验室特有的功能包括设施、技术专长和人员配备水平，这些都在选择适当的分子生物学方法中扮演重要角色。如果实验室不具备检测分枝杆菌的专业技术，应将标本送至具备相

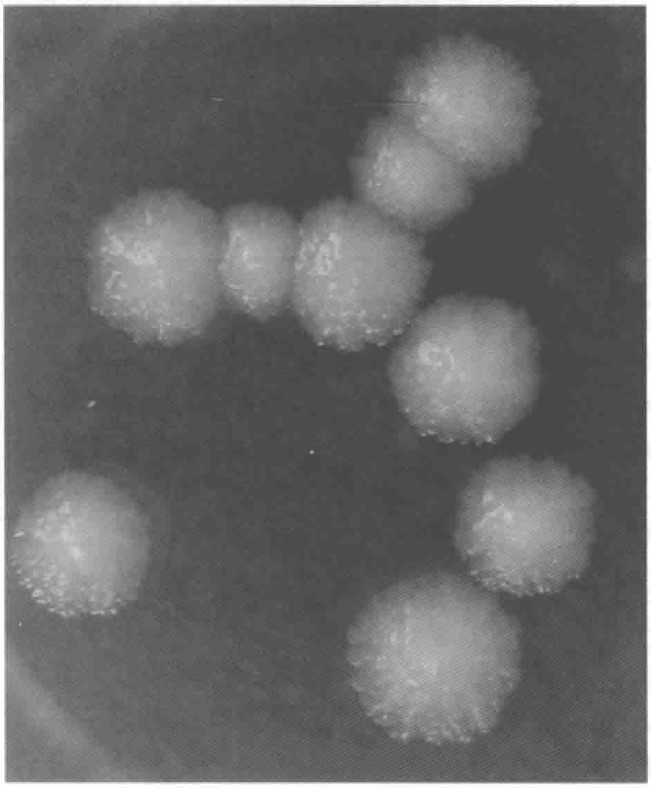


图 33-2 Middlebrook 琼脂上生长 10 天的戈登分枝杆菌。菌落呈黄色、光滑形态（暗产色性），见彩插

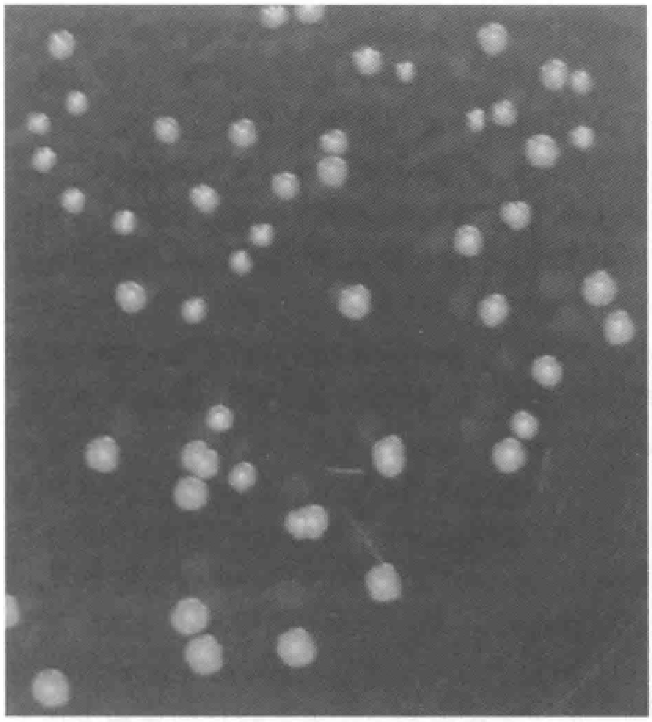


图 33-3 7H10 Middlebrook 琼脂上生长 10 天的隐蔽分枝杆菌。菌落呈细小、无色、光滑形态（不产色性），见彩插

关技术的参考实验室进行检测。而在对待未知的分枝杆菌分离株时，应当把它作为结核分枝杆菌对待，并采取适当的安全措施，包括 3 级生物安全（BSL3）措施和设备，直到结核分枝杆菌被排除为止，这一点也非常重要。这一方法普遍应用于鉴定如下所述分枝杆菌的临床实验室，分枝杆菌最常见的鉴定方法是使用 AccuProbe 核酸杂交探针法和以 16S、*rpoB* 或 *hsp*65 为靶点的 DNA 测序法。MALDI-TOF MS 也正在成为临床实验室所使用的常规方法。同时全基因组测序的能力也不断成熟，因此这种鉴定方法的使用率也可能提高。

七、基因型鉴定

（一）全基因组测序

在许多分枝杆菌的菌种中，全基因组测序已经完成。所有基因组计划的详细信息，无论已经完成还是仍在进展中都可以从下列网站中获得：https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/microbes/。Tortoli 等在最近的研究中提出，对每一种新型分枝杆菌菌种的描述都需要进行全基因组测序[27]。

（二）单基因或 16S～23S rRNA 间隔区序列分析

对特定的基因进行部分序列分析或对 16S 和 23S rRNA 基因内部转录间隔区（ITS）进行测序是分枝杆菌菌种鉴定最实用的方法。不同菌种序列的可变性和同种间细菌序列的同质性是测序分析的基本前提。对于 16S rRNA 基因、*hsp*65、*rpoB* 和 ITS 内特定区域的测序，已经被常规用来鉴定 SGM 菌种，具体内容将在下文详细讲述[28-31]。

1. 16S rRNA 基因 对于分枝杆菌的常规鉴定，完整的 16S rRNA 基因（约 1500 bp）序列分析不实用，通常也不必要。在该基因 5′末端的大约 500 bp 的核酸序列信息对于菌种的鉴定已经足够。分枝杆菌 16S rRNA 基因用于扩增和测序的特异性引物（表 33-3）已被描述和验证，商品化试剂盒也可买到，但是尚未获得美国 FDA 批准[32-33]。

16S rRNA 基因包含能够对多数 SGM 进行菌种鉴定的保守和可变序列区域。一些 SGM 具有相同的高变 A 和 B 区域或完全相同的 16S rRNA 基因序列。它们包括 MAC 中的一些菌种

或亚种，如海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌(序列变异株Ⅰ和Ⅳ)和胃分枝杆菌。为了准确鉴定这些菌种，需要对其他基因或区域(如ITS、*hsp*65和*rpoB*)进行序列分析。此外，还有一些SGM菌种存在较小的种内16S rRNA基因序列变异，仅相差几个碱基对(如戈登分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌和慢生黄分枝杆菌)[34-36]。

表33-3 几种分枝杆菌靶基因/序列扩增及测序的引物

靶点	引物和方向[a]	序列	产物大小(bp)	参考文献
16S rRNA	285,F	5′-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG	～1000	99
	264,R	5′-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA		
16S rRNA	B9,F	5′-CGT GCT TAA CAC ATG CAA GTC	～500	100
	247,R	5′-TTT CAC GAA CAA CGC GAC AA		
ITS 1	Sp1,F	5′-ACC TCC TTT CTA AGG AGC ACC	～300	39
	Sp2,R	5′-GAT GCT CGC AAC CAC TAT CCA		
ITS 1	ITS 1,F	5′-GAT TGG GAC GAA GTC GTA AC	～300	35
	ITS2,R	5′-AGC CTC CCA CGT CCT TCA TC		
*hsp*65	TB11,F	5′-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT	441	101
	TB12,R	5′-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT		
rpoB	Myco,F	5′-GGC AAG GTC ACC CCG AAG GG	723	28
	Myco,R	5′-GC GGC TGC TGG GTG ATC ATC		

注：[a]F. 正向；R. 反向

部分16S rRNA基因的焦磷酸测序，也已经被用于分枝杆菌的鉴定。焦磷酸测序与Sanger测序的不同之处在于，它依赖于检测测序过程中核苷酸结合时焦磷酸盐释放，而不是依赖双脱氧核苷酸链的终止反应。焦磷酸测序法进行分枝杆菌的鉴定，重点在于16S rRNA基因的高变区A中的一段长20～30 bp的区域[37-38]。Bao等研究对抗酸杆菌(AFB)的分离株进行焦磷酸测序，并与表型分析和Sanger测序法比较，结果显示，焦磷酸测序能够识别117例AFB中的114例(98%)，同时能够把多数的SGM鉴定到种水平[38]。已检测的分枝杆菌中，焦磷酸测序不能把瘰疬分枝杆菌(*M. scrofulaceum*)和猿分枝杆菌(*M. simiae*)鉴定到种。如本章基因分析部分所述，类似于16S rRNA基因的Sanger测序，在鉴定一些密切相关的微生物时，焦磷酸测序具有相同的局限性。

焦磷酸测序是一种快速、简单、廉价鉴定分枝杆菌菌种的分子生物学方法。但是由于这种技术产生的序列长度短，所以可能需要额外的测序来区分一些菌种。

2. ITS 1区域 内部转录间隔区序列在操纵子上将16S rRNA和23S rRNA基因分隔开并命名为ITS 1。该片段序列仅有200～330 bp，因此很容易分析。几套能够进行完整片段扩增和测序的引物已公布(表33-3)[35,39]。

在菌种间ITS 1内的高变序列，已经被作为SGM鉴定的靶点[40]。但是已观察到有些SGM菌种(猿分枝杆菌和蟾分枝杆菌)的ITS 1中，存在两种或更多的序列变异。与16S rRNA基因序列一样，海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌有相同的ITS 1序列，故该序列不能用于区分这2种细菌。ITS 1序列区域还可以被用来区分苏尔加分枝杆菌(*M. szulgai*)和神仙鱼分枝杆菌(*M. angelicum*)。

3. *hsp*65基因 *hsp*65基因的5′末端约440 bp的基因片段，是用于鉴定分枝杆菌早期的基因靶点之一。该基因编码65 kDa的热休克蛋白，同时也被称为*groEL*2基因。

与16S rRNA基因相比，部分*hsp*65基因测序的优势在鉴别亲缘关系较近的菌种方面尤为明显，因为*hsp*65基因的保守性较16S rRNA基因低。*hsp*65基因测序可区分海分枝杆菌与溃疡分枝杆菌、胃分枝杆菌与堪萨斯分枝杆菌。而鸟分枝杆菌鸟亚种(*Mycobacterium avium* subsp. *avium*)、鸟分枝杆菌副结核亚种(*Myco-*

bacterium avium subsp. *paratuberculosis*）与鸟分枝杆菌人猪亚种（*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*）可以通过在 3′末端测序进行区分[29,41-42]。

4. *rpoB* 基因 *rpoB* 基因编码细菌 RNA 聚合酶的β亚基。对于 NTM 菌种来说，*rpoB* 基因序列的可变性可用于菌种的鉴定[28,43]。在约 3600 bp 的 *rpoB* 基因中，几个不同的序列片段已用于扩增和测序。Kim 等[44]扩增了 1362～1668 位（称为 2/3 区间）包含 306 bp 的片段。而 Lee 等[43]则以 902～1261 位包含 360 bp 的序列为目标（称为 1/2 区间）进行分析[28]。相比之下，Adékambi 等[28]选择了位置更远的一个片段（第 5 区间），分析了一段 2573～3337 位约 760 bp 的序列片段（表 33-3）。Kim 等[44]和 Lee 等[43]的研究包含了许多慢生长分枝杆菌的模式菌株。而对第 5 区间[28]的详细序列分析则主要在快生长分枝杆菌中完成。*rpoB* 基因还可用于区分海分枝杆菌与溃疡分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌与胃分枝杆菌、苏尔加分枝杆菌与神仙鱼分枝杆菌（*M. angelicum*）。

八、序列数据库的使用

利用测序分析进行分枝杆菌的鉴定，会经常用到公共数据库，而这就会给我们带来挑战。公用数据库包含有菌种未知的菌株序列，菌种已知但菌株序列存在变异以及许多未经过培养也无深入描述的细菌序列。此外，含有碎片和错误的陈旧序列也仍然存在于公共数据库中[45]。NCBI 参考序列（RefSeq）数据库是公开的、经过校准的参考数据库，其中包含许多注释良好分枝杆菌属菌种的基因组信息[46]。

因此，临床医生对于搜索结果的评估一定要非常谨慎。例如，对于一例罕见的菌种，利用《原核细胞生物名称目录》[*the List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*（http://www.bacterio.net）]就能很容易地完成对有效描述为一个菌种的再次复核。当获得来自不同菌种的几个不同的结果时，它可以帮助临床医生检查数据库条目，看是否序列已从该型菌株获得。列出官方验证菌种的其他资源，包括本书和《国际系统与进化微生物学杂志》。

国际合作核苷酸测试数据库（INSDC；http://www.insdc.org/）可用来分析上述源自不同基因的序列。现有一些专业数据库和分析工具用于 16S rRNA 基因序列分析，如商品化的付费工具：SmartGene IDNS（SmartGene，Lausanne，Switzerland）、RipSeq（Isentio，Sunnyvale，CA）和 MicroSeq 微生物鉴定系统（Applied Biosystems，Foster City，CA）。2 种免费的在线工具软件：核糖体数据库项目（RDP，http://rdp.cme.msu.edu/）和 EZ 生物云（www.ezbiocloud.net）。这些数据库的优势在于对条目的质量控制和管理，而不是真正的不限制提交的公共数据库。对于商业网站数据库来说，使用者也可根据自身需要选择更新系统。但是这些专业数据库可能滞后于更新的 INSDC 数据库，也可能不包括一些菌种的序列变种。

九、NTM 的其他分子检测方法

用于分枝杆菌鉴定的靶向基因序列分析，在多数的临床实验室作为常规检测可能并不实用。而基于固相或液相杂交的商品化检测方法则更容易在日常工作中实施，它们用于对一些临床相关性高的分枝杆菌菌种进行检测，并且可以在固体和液体培养基中进行操作。

（一）AccuProbe 培养鉴定法

AccuProbe（Hologic/GenProbe，Marlborough，MA）是首个商品化的分子检测方法，能鉴定阳性培养基上特定的分枝杆菌菌种。能用其探针来鉴定的分枝杆菌包括 MTBC、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、鸟分枝杆菌复合群、戈登分枝杆菌和堪萨斯分枝杆菌。所有的检测探针都获美国 FDA 批准并有市售试剂盒。菌种鉴定的原理是特异的 DNA 探针与细菌 rRNA 相杂交。简单来说，首先通过加热和超声将核酸包括 16S rRNA 从分枝杆菌中释放出来，之后特异性的 DNA 探针与目标 rRNA 相杂交，最终可通过化学发光法将 DNA-rRNA 杂交分子检测出来，其结果可在 2 h 内获得。该方法的实用性已被世界各地研究所的报道证实[35,47-48]。探针的特异性有报道在 96%～100%的范围内。敏感性数值则随检测对象不同而异：检测戈登分枝杆菌的敏感性为 100%，MAC

为 95.2%，堪萨斯分枝杆菌为 97.4% ～ 100%[35,48]。然而，该探针法也有一些缺点，如探针只局限于一些重要的分枝杆菌菌种，对于探针检测为阴性的菌种，必须要进行额外的检测来鉴定菌种。对每个目标菌种进行单独检测致使检测费用昂贵，而且如果不同时进行检测，也较为耗时。已有报道 MAC 探针出现假阳性的结果，但这可以使用较高的临界值(80 000 相对光单位，而不是技术手册推荐的 30 000 相对光单位)来避免[49]。有研究也发现，胞内分枝杆菌探针与一些慢生长分枝杆菌(奥尔胡斯分枝杆菌、奇美拉分枝杆菌、内布拉斯加分枝杆菌和莎斯喀彻温分枝杆菌)之间存在交叉反应[50]。类似的交叉杂交反应已经在 MAC 探针与内布拉斯加分枝杆菌、沼泽分枝杆菌、莎斯喀彻温分枝杆菌和石蜡分枝杆菌之间被证实。

(二)线性探针技术

另外，将 PCR 和反向杂交设计的 DNA 条带技术(线性探针技术)结合起来的方法也已研发出来。简单地说，就是采用生物素标记的引物对目标序列进行 PCR 扩增，将 PCR 扩增产物与固定在条带上包被有种特异的序列片段探针杂交，随后通过酶介导的显色反应显色，最终通过肉眼观察并与结果解释表比较来进行带型的判读。菌种的鉴定依赖特定的带型(图 33-4)。

目前，3 种基于该方法的几种分枝杆菌菌种鉴定试剂盒已有市售。它们带有 CE 标记，但都没有获得美国 FDA 的批准。INNO-LiPA Mycobacteria v2 assay(Fujirebio，Ghent，Belgium)通过 16S-23S rRNA 基因间隔区的核苷酸差异来检测 MTBC 和下列慢生长分枝杆菌：堪萨斯分枝杆菌、蟾分枝杆菌、戈登分枝杆菌、日内瓦分枝杆菌、猿分枝杆菌、海分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、隐蔽分枝杆菌、鸟分枝杆菌/胞内分枝杆菌/瘰疬分枝杆菌复合群(MAIS)、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、玛尔摩分枝杆菌和嗜血分枝杆菌。

GenoType Mycobacterium CM/AS test (Hain Lifescience，Nehren，Germany) 检测的是 23S rRNA 基因上具有菌种特异性的序列。它由 2 种不同的条带组成(条带 CM 检测常见的分枝杆菌，条带 AS 可检测其他一些分枝杆菌菌种)。该方法可鉴定 MTBC 和下列慢生长分枝杆菌。条

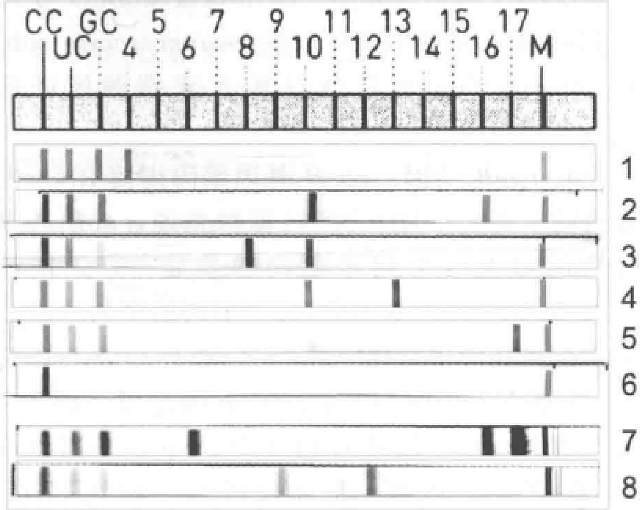


图 33-4 线性探针技术(GenoType Mycobacterium CM/AS)用于分枝杆菌菌种的鉴定。CC. 结合质控；UC. 通用质控；GC. 属特异性质控；4～17. 菌种鉴定的特异条带；M. 标记线(膜条最上层标记)。1～6 为 CM 膜条；7 和 8 为 AS 膜条。第 1 条带，鸟分枝杆菌；第 2 条带，MTBC；第 3 条带，戈登分枝杆菌；第 4 条带，玛尔摩分枝杆菌；第 5 条带，蟾分枝杆菌；第 6 条带，阴性质控；第 7 条带，日内瓦分枝杆菌；第 8 条带，嗜血分枝杆菌，见彩插

带 CM：鸟分枝杆菌、戈登分枝杆菌、胞内分枝杆菌/奇美拉分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌/石蜡分枝杆菌/副瘰疬分枝杆菌、居间分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、玛尔摩分枝杆菌/嗜血分枝杆菌/沼泽分枝杆菌/内布拉斯加分枝杆菌、海分枝杆菌/溃疡分枝杆菌及蟾分枝杆菌。条带 AS：猿分枝杆菌、隐蔽分枝杆菌(1 型和 3 型)、日内瓦分枝杆菌/三重分枝杆菌、慢生黄分枝杆菌、黑克肖分枝杆菌、苏尔加分枝杆菌/中间分枝杆菌、嗜血分枝杆菌/内布拉斯加分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、胃分枝杆菌、亚洲分枝杆菌和下出分枝杆菌(用斜线分开 2 种或以上的菌种代表着它们具有相同的带型)。The Hain GenoType NTM-DR 线性探针技术可以检测几种 NTM 菌种，以及氨基糖苷类和大环内酯类的抗药性标志物。

上述两种方法都可检测来自固体或液体培养基上的菌落，且可在 4～6 h 内获得结果。几项研究评估了这些检测技术的实用性。GenoType CM 和 AS 与测序法有 89.9%～98.6% 的结果一致[51-52]。单独采用 GenoType CM 方法可鉴定大多数(高达 96%)常见的菌种[51]。但该方法的不足之处在于一种分辨模式存在于一种以上的菌种

中，需要采用其他技术进行进一步鉴别（如对其他基因靶点的测序或生化检测），这会导致得到最终结果时间的延迟[51,53]。INNO-LiPA 与标准方法有 92.2%～98.4%的结果一致[53-54]。该方法可进一步将堪萨斯分枝杆菌和龟分枝杆菌菌株鉴定到亚型，菌株分型的临床意义尚不清楚，主要还是表现在流行病学价值。

采用线性探针技术，可快速鉴定 90%以上的常见分枝杆菌。但在少数情况下可能出现错误的鉴定结果[50-51]。如采用 GenoType AS 检测时，只有观察到在固体培养基上生长速率适当，并且具有典型的菌落形态的隐蔽分枝杆菌才可以报告。最近的研究显示，GenoType 方法的胞内分枝杆菌探针与一些慢生长分枝杆菌存在交叉反应，包括奥尔胡斯分枝杆菌、奇美拉分枝杆菌、哥伦比亚分枝杆菌、曼藤分枝杆菌和莎斯喀彻温分枝杆菌[50]。GenoType 将 2 种不常见的 NTM 菌种：利雅得分枝杆菌和尚未证实的菌种"模仿分枝杆菌"错误地分到了 MTBC 中[50]。同样地，INNO-LiPA MAIS 方法与奥尔胡斯分枝杆菌、海德堡分枝杆菌、曼藤分枝杆菌、内布拉斯加分枝杆菌、副瘰疬分枝杆菌和石蜡分枝杆菌有交叉反应[50]。重要的是，没有关于任何一种线性探针系统将 MTBC 成员错误鉴定为 NTM 的报道[50]。线性探针法得出的所有结果应当通过重要公认的表型特征进行确认，如生长速率、菌落形态和色素形成情况。

第 3 种线性探针方法 Speed-oligo Mycobacteria（Vircel，Granada，Spain）同时针对 16S rRNA 和 16S～23S rRNA 区域。它能鉴定 19 种分枝杆菌菌种，包括 MTBC（结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、田鼠分枝杆菌、非洲分枝杆菌和山羊分枝杆菌）和 10 种 NTM（鸟分枝杆菌、戈登分枝杆菌、居间分枝杆菌、胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、玛尔摩分枝杆菌、海分枝杆菌/溃疡分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌和蟾分枝杆菌）。与其他方法相比，Speed-oligo 分枝杆菌系统的菌种鉴定谱较局限，只能将许多分枝杆菌鉴定到复合群或组。它可在 3 h 内对来自固体或液体培养基上的菌落进行鉴定。迄今发表的研究中，与临床相关的错误鉴定包括海分枝杆菌被错误鉴定为堪萨斯分枝杆菌，堪萨斯分枝杆菌被错误鉴定为 MTBC，以及将单独分离的龟分枝杆菌和外来分枝杆菌被错误鉴定为脓肿分枝杆菌[55-57]。该系统直接用于呼吸道标本检测的评估结果显示，其总的敏感性为 76%（涂片阳性标本的敏感性为 93%，涂片阴性标本的敏感性为 56%），特异性为 99%。结论显示，Speed-oligo 分枝杆菌系统是一种简单、快速的检测分枝杆菌的方法，并能区别 MTBC 和 NTM，尤其是涂片阳性的标本[58]。

（三）质谱技术

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）正在彻底改变微生物的鉴定方式，目前该技术已应用于分枝杆菌的鉴定。分枝杆菌的 MALDI-TOF MS 分析包括灭活、提取和分析 3 个步骤。分枝杆菌的灭活和提取已有一些不同的方法。处理抗酸阳性的培养物时，由于 MTBC 的生长潜力，所以需要格外关注生物安全问题。这些方法不同于其他细菌和真菌的提取方法。所有的灭活和提取步骤应当在生物安全 3 级（BSL-3）设施中进行并使用适当的个人防护装备。有关分枝杆菌 MALDI-TOF MS 分析的相关生物安全问题的附加信息见第 32 章。对于完整细菌[59]和纯化蛋白质提取方法[60-61]的 MALDI-TOF MS 分析已有相关的描述。分枝杆菌细胞的灭活与提取比其他细菌或酵母更具挑战性，通常是通过乙醇或热处理，以及使用微型小杵捣碎或玻珠击打技术使菌体机械分离或裂解。之后往灭活的分枝杆菌中加入甲酸和乙腈进行提取操作[60]。在完成灭活和提取之后，取一部分样品点样至固体靶板上，并在上面滴加化学基质（如 α-氰基-4-羟基-肉桂酸）覆盖。然后，MALDI-TOF MS 按照第 5 章中的说明执行。目前，有 2 种市售用于微生物鉴定的 MALDI-TOF MS 平台，即梅里埃 Vitek MS（bioMerieux，Durham，NC）和布鲁克 Biotyper 系统（Bruker Daltonics，Billerica，MA）[59-62]。这 2 种设备提供的数据库均包含了临床常见的 MTBC 和 NTM。MALDI-TOF MS 数据库在菌种覆盖范围和菌株多样性方面正被不断改进，但有许多少见的菌种可能仍未包含在内，这可能需要用户终端自行添加或等待厂商的数据库更新。像序列数据库和 MALDI-TOF MS 数据库，都需要仔细评估其准确性，特别是对于新物种的描述。

目前研究表明，MALDI-TOF MS 可作为一种快速、准确的方法用于固体培养基上分枝杆菌的鉴定方法。而据报道，MALDI-TOF MS 直接

鉴定阳性液体培养基中的NTM未必准确[59-61,63]。Saleeb等[60]报道了MALDI-TOF MS的应用，用它鉴定了17种菌种组成的104株分枝杆菌分离株。其他报道也证明MALDI-TOF MS可以明确鉴定一些最常见的SGM菌种[62,64]。但是，根据目前的研究，奇美拉分枝杆菌与胞内分枝杆菌，以及MAC的其他菌种并不能够被区分[59,65]。土分枝杆菌复合群的菌种亦不能被MALDI-TOF MS区分[62]。

与分子测序方法相比，MALDI-TOF MS鉴定存在的一个潜在困难是需要细菌在固体培养基上适度生长，而不像测序只需要少量生长就够了。毫不奇怪，该问题在慢生长分枝杆菌的鉴定上表现得最明显[62]。在这种情况下，测序的周转时间（即12～24 h）可能会比MALDI-TOF MS更快。

十、分型系统

从历史来看，第1个用于鸟分枝杆菌的菌株分型的方法是基于血清凝集试验的血清学分型。将血清学分型和种特异的DNA探针联合应用，发现以前命名为血清型1～6和8～11的细菌是鸟分枝杆菌，而血清型7、12～17、19、20和25是胞内分枝杆菌。用于MAC和其他分枝杆菌的血清学分型方法已逐渐被菌株的分子分型所取代。不同的遗传学方法已经被用于NTM菌株之间的对比。全基因组分析包括脉冲场凝胶电泳（PFGE）[66-67]，扩增片段长度多态性分析[68]和使用特异性分子标志物的限制性片段长度多态性（RFLP）分型[69]。对于PFGE和扩增片段长度多态性分析，无需遗传学信息，可以在没有进一步了解菌种基因组信息的条件下进行试验。而对于RFLP分型，一些遗传信息，如特异性IS元件的存在，则是一个先决条件。

（一）脉冲场凝胶电泳

PFGE一直是SGM菌株分型一种非常有用的技术。该技术需要生长活跃的培养菌株并在3～4周内完成。其标准化最常见的问题可能来自粗糙菌株的聚集成块现象，这种现象可能会导致同一菌株不同批次之间DNA的量不同，造成难以解释的不均匀的（轻的和过重的）电泳条带。既往的研究已经详细介绍了PFGE用于堪萨斯分枝杆菌、苏尔加分枝杆菌和MAC的临床和流行病学研究[70-72]。最近，该方法已用于研究大环内酯类药物敏感和耐药菌株，以及结节性MAC病和支气管扩张患者的多种培养分离菌株[70]。该方法另一个重要的点在于能够区分“新发感染”与“复发感染”[73]。

（二）多位点序列分型

NTM分型的另一种方法是对高度变异性的序列进行多基因分析，如*hsp*65基因或ITS区域。然而，这些现有的序列的多态性，至今还没有达到可用于流行病学分析所需的变异水平。随着全基因组分析的发展，多位点序列分析很可能成为NTM分型更有应用价值的方法。

（三）基于重复单元序列的PCR

基于重复单元序列的PCR（Rep-PCR）已用于一些慢生长分枝杆菌菌种的暴发疫情控制，包括猿分枝杆菌、戈登分枝杆菌、土分枝杆菌、结核分枝杆菌和鸟分枝杆菌复合群[74-75]。该方法可采用商品化的DiversiLab系统（bioMérieux，Durham，NC）进行分析。尽管该方法采用专利技术，该公司提供了一个网络版的Rep-PCR序列数据库，可用于序列的检索匹配。但是目前很少有研究将Rep-PCR的结果与PFGE的结果进行比较。

（四）数目可变的串联重复序列

分散分枝杆菌数目可变的串联重复序列（MIRU-VNTRs）分析，最早用于鸟分枝杆菌副结核亚种（MAP）的分型，现已扩展到MAC的其他菌株[76]。虽然VNTR位点通常具有种属特异性，但是VNTR技术的低成本、可重复、DNA需要量少和检测速度快，使得VNTR技术可能替代PFGE用于MAC的分型[77]。

（五）IS1245/IS900的RFLP分析

鸟分枝杆菌是NTM菌株分型中研究最广泛的。对插入序列IS1245的RFLP分析仅限于鸟分枝杆菌的基因分型。该技术的标准于1998年提出[78]，但未得到广泛应用。Mijs等[79]用该方法区分从鸟标本分离到的鸟分枝杆菌鸟亚种是来自猪和人，给它们取名为“鸟分枝杆菌人猪亚种”。对插入序列IS900的RFLP分析可用于MAP的基因分型。

对"鸟分枝杆菌人猪亚种"菌株 104 和 MAP 菌株 K-10 的全基因组序列研究发现，其差异区域可用于其他基因分型技术的标准化[69]。根据基因组序列数据，大序列的多态性已证实不同的鸟分枝杆菌菌株之间的变异性。通过使用多位点序列分型技术，许多包含多个序列变异的基因，现在可以实现同步分析[42]。

十一、抗菌药物敏感性试验

临床相关分枝杆菌的抗菌药物敏感性试验(antimicrobial susceptibility testing，AST)对于许多分枝杆菌引起的感染控制至关重要，对所有的临床分离菌种都应根据 CLSI 指南进行药敏性试验[16]。该操作过程技术上要求高且需要严格的安全防护措施，尤其是涉及液体培养物进行药敏试验时。当处理高浓度杆菌的阳性培养物时，交叉污染是另一个关键问题。因此，抗菌药物敏感性试验只能由经验丰富的人员来完成。

NTM 的 AST 需要操作人员对每个菌种的特征有足够的了解和相关操作技能。因此，CLSI 一直建议那些很少接触 NTM 的实验室将其分离菌株送到合格的参考实验室进行 AST。那些选择进行室内 NTM AST(包括 SGM 和 RGM)的实验室应当按照如美国病理学家协会等特定认证机构所要求的那样，仔细验证他们的实验结果并定期进行能力验证[16]。

微量肉汤稀释法是 CLSI 推荐的对于 SGM 和 RGM 的参考方法。最有效的方式是在 96 孔微量板上采用一系列倍比稀释的抗菌药物进行操作。特别是对一些 SGM，具有建议折点的抗菌药物包括阿米卡星、环丙沙星、克拉霉素、多西环素、乙胺丁醇、利奈唑胺、米诺环素、莫西沙星、利福布汀、利福平和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑[16]。

对一些临床相关的 SGM，包括 MAC、堪萨斯分枝杆菌都应该进行抗菌药物敏感试验[16]。CLSI、美国胸科协会(ATS)和美国感染病学会(IDSA)声明建议对于堪萨斯分枝杆菌只报告利福平和克拉霉素药敏结果，除非是利福平耐药的分离株，才对之前所列出的抗菌药物(除了没有折点的米诺环素和多西环素)进行药敏测试[9,16]。

在 CLSI 文件 M24-A2 中，并未推荐对海分枝杆菌进行常规的药敏试验。在对海分枝杆菌引起感染的特效药物(即克拉霉素、乙胺丁醇和利福平)出现耐受或疗效不佳时，才对上述抗菌药物进行药敏测试(因其目前尚无折点，利奈唑胺除外)[16]。

对于 MAC，因为既往的研究已经表明，除了克拉霉素和阿米卡星以外，药物 MIC 与患者对药物的临床反应之间并没有相关性，所以只推荐做这 2 种抗菌药物的药敏试验[80]。阿米卡星对于 MAC 分离株的折点，已经向 CLSI 提交，但尚未得到批准[80]。而莫西沙星和利奈唑胺的初步解释标准也已被提出，但至今还没有进行临床相关性方面的研究，并且这种药物对于 MAC 临床疗效也尚未知晓[16]。

其他 SGM 菌种没有足够的数据来制定药敏试验的具体建议。因此，CLSI M24-A2 文件建议对于这些 SGM 的药敏试验，应当遵循利福平耐药的堪萨斯分枝杆菌药敏指南执行。

需要在培养基补充物质才能生长的营养要求较高的菌种，包括需要铁和氯化血红素的嗜血分枝杆菌，以及需要分枝杆菌素的日内瓦分枝杆菌。嗜血分枝杆菌采用一种替代的琼脂纸片扩散法进行药敏试验，该方法是在融化的琼脂中加入商品化的抗生素纸片。CLSI 推荐测试的抗菌药物包括阿米卡星、环丙沙星、克拉霉素、多西环素或米诺环素、利奈唑胺、利福平和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑[16]。但是对于日内瓦分枝杆菌最佳的药敏试验尚未确立。在对这些营养要求较高的菌种进行药敏试验之前，实验室需要进行他们自己的内部验证[16]。

关于 AST 操作的详细描述和讨论见本书第 78 章。

十二、结果的评价、解释和报告

SGM 的快速、敏感的检测、鉴定和药敏试验方法的实施，对于 NTM 疾病的诊断和控制显得极为重要。分枝杆菌涂片荧光染色及肉汤培养系统的应用，DNA 探针、MALDI-TOF MS 或序列分析技术在菌种鉴定方面的应用，为制定患者所需最适照护方案提供了最佳证据。正如本章所强调的，慢生长分枝杆菌菌种的表型检测使用受限，应该仅与分子生物学技术结合使用。实验室工作安排应优先保证 SGM 鉴定和有临床意义分离株的药敏试验结果的及时性、准确性。

CLSI 指南推荐抗酸涂片阳性应在 24 h 内报告

结果，如果在接种的固体培养基上看到有细菌生长或液体培养基检测到阳性信号，应当发送临时报告。一旦菌种鉴定完成，应当发送确认报告。此外，一旦药敏试验完成，也应当及时报告(SGM 通常在 14 天之内)。为了满足指南的要求，液体培养基快速检测系统和固体培养基的使用极为关键[9,16-17]。

为采用分子生物学技术开发一种更连贯且实用的鉴定方法，CLSI 发布了 DNA 靶点测序用于分枝杆菌菌种鉴定的解释标准，包括同一性百分比临界值的共识[17]。文件指出，分枝杆菌 16S rRNA 部分(500 bp)基因序列的属和种的相同度为 100%，则可报告为明确的属和种。但是，对于那些同一性为 99.0%～99.9%的分离菌株，指南推荐可报告为“与(给定菌种)亲缘关系最近的分枝杆菌”；如果待检菌种的同一性为 95.0%～98.9%，则结果应表明该分离菌株不能通过 16S rRNA 基因测序进行明确的鉴定，鉴定结果应当为“与分枝杆菌属(*Mycobacterium* sp.)亲缘关系最近”。

NTM 菌种的微观异质性(如 16S rRNA 基因与参考菌株的序列有 1～5 个碱基的差异)在一些慢生长分枝杆菌中有描述，如戈登分枝杆菌、波西米亚分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、隐蔽分枝杆菌、慢生黄分枝杆菌。总之，分枝杆菌属之间 16S rRNA 基因序列的亲缘关系密切，可能仅有几个碱基不同或根本就没有差异。在没有明显表型差异时，要想明确鉴定可能就会异常困难。Turenne 等认为，对于模棱两可的个别菌株应当选择最佳的高质量序列数据库进行比较并仔细检查，即便如此，由于没有其他备选靶点的测序分析，其结果可能仍不确定[45]。

在 SGM 中，一些菌种仅用 16S rRNA 基因测序是不能辨别的。例如，堪萨斯分枝杆菌、胃分枝杆菌、海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌的 16S rRNA 全基因是一致的，在这种情况下，菌种的确定有赖于其他备选基因靶点或光产色性和(或)生长速率的测定。当 16S rRNA 基因不足以进行菌种的鉴定时，其他备选基因靶点包括 ITS 1 区、*hsp*65、*gyrB*、*rpoB*、*recA* 和 *dnaA* 基因等能帮助进行鉴定。但这些备选基因不像 16S rRNA 基因那样推荐具体临界值。

最后，针对有临床意义的菌种进行适当的药敏试验，对于 SGM 感染患者有效治疗十分重要。

参考文献请扫二维码查阅

第34章　分枝杆菌属：快速生长分枝杆菌的临床和实验室特征

BARBARA A. BROWN-ELLIOTT，RICHARD J. WALLACE，JR.

（耿燕　译；赵建宏、刘文恩　审校）

一、分类和描述

快速生长分枝杆菌（rapidly growing mycobacteria，RGM）一般被定义为在实验室培养基上7天内可生长出的非结核分枝杆菌[1]。RGM含有长链脂肪酸，被称为分枝菌酸，可采用色谱技术如高效液相色谱（high-performance liquid chromatography，HPLC）进行定量。在分子生物学时代到来之前，大多数主要的参考实验室采用HPLC进行RGM菌种的鉴定。然而，在大部分实验室该方法现已被更明确的分子生物学方法所取代以便进行更准确的菌种鉴定[2]。

目前，有超过160种非结核分枝杆菌（nontuberculous mycobacteria，NTM），其中约89种是RGM。超过一半的RGM是自20世纪90年代早期以来发现的，2014年以来，仅4种新被证实的致病菌种：海马分枝杆菌（*Mycobacterium hippocampi*，2014）[4]、快生黄色分枝杆菌（*M. celeriflavum*，2015）[4]、安阳分枝杆菌（*M. anyangense*，2015）[5]和圣保罗分枝杆菌（*M. saopaulense*）[6]被加入列表中。虽然富兰克林分枝杆菌（*M. franklinii*）在2011年被发现，但直到2015年才被确认[7]。另外，最近将脓肿分枝杆菌种进一步分为3个亚种，之前的脓肿分枝杆菌现在称为脓肿分枝杆菌脓肿亚种（*M. abscessus* subsp. *abscessus*），2种既往提到的菌种马赛分枝杆菌（*M. massiliense*）和博氏分枝杆菌（*M. bolletii*）已合并提议为另一种脓肿分枝杆菌亚种——脓肿分枝杆菌博氏亚种（*M. abscessus* subsp. *bolletii*），该亚种已被基因序列数据重新检测并发现代表2个独立的亚种[8-9]。先前的合并命名（即脓肿分枝杆菌博氏亚种）被认为是有争议的，因为在之前命名的马赛分枝杆菌分离株中不存在功能基因 *erm*，而相反地，以前称为博氏分枝杆菌的分离株含有功能基因 *erm*，使之对大环内酯类药物产生诱导性耐药。因此，2012年，对脓肿分枝杆菌博氏亚种（既往称为博氏分枝杆菌）和脓肿分枝杆菌马赛亚种（既往称为马赛分枝杆菌）基因组序列的描述，有助于解决有关菌种的一些问题并为更好地区分亚种提供信息[10-12]。

沉积分枝杆菌（*M. sediminis*）和阿拉伯分枝杆菌（*M. arabiense*）这2种无色素、非致病性的菌种，迄今为止仅在中国南海的土壤样本中被报道过。在新近确认的4种RGM中，已知有2种对人类有致病性，另外2种，即安阳分枝杆菌和海马分枝杆菌，分别为牛和海洋生物的致病菌。以其黄色色素沉着命名的快生黄色分枝杆菌，从来自土耳其、伊朗和意大利的6例患者的肺标本中获得。圣保罗分枝杆菌已在人和鱼中分离得到，其与龟分枝杆菌-脓肿分枝杆菌复合体有亲缘关系。有趣的是，这些分离株常会导致它们生长的培养基发生褐变[6]。这一菌种已从2例患者的角膜标本和一例巴西子宫颈脓肿患者的标本中分离得到。在此之前，可能与龟分枝杆菌混淆的该菌种也于2004年从2只斑马鱼中分离出来，但当时并未被确认为新菌种[13]。富兰克林分枝杆菌是从鼻窦和肺部气道疾病患者（主要在美国东北部）体内分离得到的龟分枝杆菌-脓肿分枝杆菌复合体中的一种不产色素菌种，于2011年被发现，并在2015年得到证实，还有6种肺外来源的分离株被报道[7,14]。另外，从韩国本土牛的血液中分离出了产色素的安阳分枝杆

菌，而橙红色的海马快速生长分枝杆菌会导致海马的尾巴腐烂[4]。

2016 年，发现了 6 个新的 RGM 环境菌种。其包括 3 个菌种：卢泰西亚分枝杆菌（*M. lutetiense*）、蒙马特分枝杆菌（*M. montmartrense*）和来自法国巴黎配水系统的阿尔克伊分枝杆菌（*M. arcueilense*）[15]。此外，在明尼苏达州泥炭沼泽的食肉猪笼草中分离出中等生长（7 天）的暗产色菌——瓶子草分枝杆菌（*M. sarraceniae*）和弱黄色分枝杆菌（*M. helvum*）[16]，以及从印度稻田栽培土壤中分离出的橙色暗产色菌——稻螨分枝杆菌（*M. oryzae*）均被得到了证实[17]。有趣的是，稻螨分枝杆菌和瓶子草分枝杆菌在系统学上与壁分枝杆菌（*M. murale*）和东海分枝杆菌（*M. tokaiense*）最接近，这 2 个菌种分别在 1999 年和 1981 年被发现。

目前，基于色素产生和遗传相关性，RGM 可分为 6 个主要的组或复合群（表 34-1）。第 1 组不产色素的致病菌包括 10 个菌种，其中一些菌种以前被归为偶发分枝杆菌群（*M. fortuitum* group）的第三生物变种（表 34-1）[1,18-21]。

第 2 组不产色素的 RGM 是表 34-1 中列出的龟分枝杆菌/脓肿分枝杆菌群[1,22-25]。将一种既往描述的嗜鲑分枝杆菌（*M. salmoniphilum*）复苏并认为该菌种与本组有亲缘关系，尽管从鲑鱼和鳟鱼的播散性疾病中发现了该菌种，但至今尚未在人类中发现。最近富兰克林分枝杆菌被列入该组[14]。这个复合群中最新的相关成员是圣保罗分枝杆菌，如前所述，该菌从人和鱼身上获得。

第 3 组不产色素 RGM，即产黏液分枝杆菌群（*M. mucogenicum* group），目前包括 3 种细菌，见表 34-1[1,23,26]。

第 4 组 RGM，即耻垢分枝杆菌群（*M. smegmatis* group），目前由 2 种迟缓产色素的菌株——耻垢分枝杆菌（狭义的耻垢分枝杆菌）和古德分枝杆菌（*M. goodii*）组成[1,19,27]。

第五组 RGM 包括早期产色素型菌种，其通过传统的（表型）实验室方法很难鉴定。在该组中，唯一被证明有致病性的菌种是新金色分枝杆菌（*M. neoaurum*）和菌血症分枝杆菌（*M. bacteremicum*）（表 34-1），它们与导管相关性感染患者的分枝杆菌菌血症有关；而伊朗分枝杆菌（*M. iranicum*）已经在 5 例呼吸道标本、1 例手伤口和 2 例脑脊液标本中被找到[28-30]。一些新近发现的早期产色素分枝杆菌，包括加那利分枝杆菌（*M. canariasense*）、美容品分枝杆菌（*M. cosmeticum*）和慕尼黑分枝杆菌（*M. monacense*）也都具有临床意义[4-30]。该群中还有一些以前列为环境（非致病性）分枝杆菌菌种[1,30]。

表 34-1 致病性 RGM 6 个主要的组别

组别或分类群	组别或分类群内的菌种
偶发分枝杆菌群	偶发分枝杆菌、外来分枝杆菌、塞内加尔分枝杆菌、赛特分枝杆菌、败血分枝杆菌[a]、猪分枝杆菌[a]、休斯敦分枝杆菌[a]、伯尼克分枝杆菌[a]、布里斯班分枝杆菌[a]、新奥尔良分枝杆菌[a]
龟/脓肿分枝杆菌复合群	龟分枝杆菌、免疫应答分枝杆菌、脓肿分枝杆菌脓肿亚种（以往称为脓肿分枝杆菌）、脓肿分枝杆菌马赛亚种、脓肿分枝杆菌博氏亚种、嗜鲑分枝杆菌、富兰克林分枝杆菌、圣保罗分枝杆菌
产黏液分枝杆菌群	产黏液分枝杆菌、欧巴涅分枝杆菌、富西亚分枝杆菌
耻垢分枝杆菌群	耻垢分枝杆菌（以往称为狭义的耻垢分枝杆菌）、古德分枝杆菌
早期产色素 RGM	新金色分枝杆菌、加那利分枝杆菌、美容品分枝杆菌、慕尼黑分枝杆菌、菌血症分枝杆菌
玛格丽特-沃林斯基分枝杆菌群	玛格丽特分枝杆菌、沃林斯基分枝杆菌

注：[a]包括以前的第三生物亚种复合群

目前，基于 DNA 序列分析的最新研究表明，存在第 6 个无色素致病菌群，该菌群由玛格丽特分枝杆菌（*M. mageritense*）和沃林斯基分枝杆菌（*M. wolinskyi*）组成[2,24]。

上述 RGM 中新菌种的引入强调了分子生物学方法鉴定到种水平的重要性，并对目前的“群”分类的意义提出了质疑，尤其是偶发分枝杆菌群。但是，由于既往的数据（依赖基因检测方法出现之前）和发表的文章均使用“群”命名法，所以本章内容依旧保留了这些名称以便于讨论[1]。随着采用

先进的分子生物学技术获得的信息越来越多和采用这一新方法的实验室日益增多，这种群命名法可能会被逐渐淘汰。

二、临床意义

RGM 是在多种临床环境下可引起疾病的机会致病菌。3 种主要具有临床意义的 RGM 菌种造成了人类约 80％的分枝杆菌感染，即偶发分枝杆菌群（包括猪分枝杆菌）、龟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌[21,31-32]。其他一些具有潜在致病性和临床意义的 RGM 菌种见表 34-2[1,2,4,18-19,23-25,27,30,33-34]。RGM 常见于环境中，当它们与骨髓移植导管相关的脓毒症的暴发、伤口感染和其他相关疾病的假暴发有关时，常可在自来水中检出到 RGM[1,32]。对于脓肿分枝杆菌引起的慢性肺部感染而言，具体宿主还未确定。

表 34-2 目前公认的 RGM 菌种[a]

菌种	临床意义已被认可	产色素情况	独特的表型	独特(完整)的 16S rRNA 基因序列
常见的人类致病菌				
脓肿分枝杆菌脓肿亚种	是	否	否	否
脓肿分枝杆菌马赛亚种	是	否	否	否
龟分枝杆菌	是	否	是	否
偶发分枝杆菌	是	否	是	是
脓肿分枝杆菌博氏亚种	是	否	否	否
少见的人类致病菌（<20 个临床分离株或病例）				
菌血症分枝杆菌	是	是	否	是
伯尼克分枝杆菌	是	否	否	是
加那利分枝杆菌	是	否	否	是
美容品分枝杆菌	是	是	是	是
富兰克林分枝杆菌	是	否	否	否
古德分枝杆菌	是	是	否	是
休斯敦分枝杆菌[b]	是	否	否	否
免疫应答分枝杆菌	是	否	否	是
玛格丽特分枝杆菌	是	否	是	是
产黏液分枝杆菌	是	否	是	否
新金色分枝杆菌	是	是	否	是
外来分枝杆菌[c]	是	否	否	是
福西亚分枝杆菌(*M. phocaicum*)	是	否	否	否
猪分枝杆菌	是	否	否	是
塞内加尔分枝杆菌	是	否	否	否
耻垢分枝杆菌	是	是	否	是
罕见的人类致病菌（<10 个病例或分离株）				
欧巴涅分枝杆菌	是	否	否	是
布里斯班分枝杆菌	是	否	否	是
冬天分枝杆菌	是	否	否	是
快生黄色分枝杆菌(*M. celeriflavum*)	是	是	是	是
大象分枝杆菌	是	是	否	是
伊朗分枝杆菌	是	是	否	是
“乳生分枝杆菌”[d]	是	是	未知	是
慕尼黑分枝杆菌	是	是	否	是
盛冈分枝杆菌	是	否	否	是

（续 表）

菌种	临床意义已被认可	产色素情况	独特的表型	独特(完整)的 16S rRNA 基因序列
新奥尔良分枝杆菌	是	否	否	是
纽卡斯尔分枝杆菌	是	是	否	是
圣保罗分枝杆菌[e,f]	是	否	否	是
败血症分枝杆菌	是	否	否	是
赛特分枝杆菌	是	否	是	是
沃林斯基分枝杆菌	是	否	否	是
未证实的人类致病菌				
安阳分枝杆菌[g]	否	是	否	ND[h]
田野分枝杆菌	否	否	否	是
爱知分枝杆菌	否	否	否	是
蜂房分枝杆菌	否	否	否	是
阿拉伯分枝杆菌	否	否	是	是
阿尔克伊分枝杆菌	否	否	否	是
噬芳香分枝杆菌	否	是	否	是
金色分枝杆菌	否	是	否	是
南非分枝杆菌	否	是	否	是
千田分枝杆菌	否	否	否	是
氯酚分枝杆菌	否	是	否	是
楚布分枝杆菌	否	是	否	是
汇合分枝杆菌	否	否	否	是
藏红色分枝杆菌	否	是	否	否
迪尔诺弗分枝杆菌	否	是	否	是
杜瓦分枝杆菌	否	是	否	是
诡诈分枝杆菌[i]	否	否	否	是
微黄分枝杆菌	否	是	否	是
食荧蒽分枝杆菌[j]	否	否	否	否
腓特烈斯堡分枝杆菌	否	是	否	是
加地斯分枝杆菌	否	是	否	是
淡黄分枝杆菌	否	是	否	是
黑森分枝杆菌[k]	否	是	否	是
弱黄色分枝杆菌(*M. helvum*)	否	是	否	是
海马分枝杆菌[f](*M. hippocampi*)	是	是	是	是
霍德勒分枝杆菌[l]	否	是	否	否
荷尔斯泰因分枝杆菌	否	是	否	是
英苏布里亚分枝杆菌	否	否	否	是
科莫斯分枝杆菌	否	是	否	是
海滨分枝杆菌	否	是	是	是
拉特分枝杆菌	否	否	是	是
卢泰西亚分枝杆菌(*M. lutetiense*)	否	否	否	是
马达加斯加分枝杆菌	否	是	否	是
蒙马特分枝杆菌(*M. montmartrense*)	否	否	否	是
壁分枝杆菌	否	是	否	否
奥布分枝杆菌	否	是	否	是

（续　表）

菌种	临床意义已被认可	产色素情况	独特的表型	独特(完整)的 16S rRNA 基因序列
稻螨分枝杆菌(*M. oryzae*)	否	是	否	是
浅黄分枝杆菌	否	是	否	否
副偶发分枝杆菌	否	是	否	是
草分枝杆菌	否	是	否	是
海绵分枝杆菌	否	是	否	ND
耐冷分枝杆菌	否	是	否	是
食吡分枝杆菌	否	是	否	是
罗得西亚分枝杆菌	否	是	否	是
红色分枝杆菌	否	是	否	是
锈色分枝杆菌	否	是	否	是
嗜鲑分枝杆菌[g]	是	否	否	是
瓶子草分枝杆菌(*M. sarraceniae*)	否	是	否	是
沉积分枝杆菌(*M. sediminis*)	否	否	否	是
泥炭藓分枝杆菌	否	是	否	是
抗热分枝杆菌	否	是	否	是
东海分枝杆菌	否	是	否	否
牛分枝杆菌	否	是	否	是
范巴伦分枝杆菌	否	是	否	是

注：[a] 来自参考文献[102]；[b] 休斯敦分枝杆菌与缓慢生长的产鼻疽分枝杆菌完全相同；[c] 外来分枝杆菌(Ⅰ型)与败血症分枝杆菌完全相同；[d]"乳生分枝杆菌"是一种目前尚未被证实的菌种；[e] 使琼脂褐变；[f] 对海洋生物有致病性；[g] 对牛有致病性；[h] ND 即无可用数据；[i] RGM 在 30℃生长，而慢生长分枝杆菌则在 37℃生长；[j] 16S rRNA 基因序列与未被证实的菌种"*M. hackensackense*"序列相同；[k] 在 65℃生长；[l] 可降解或在多种有机基质上生长

(一)社区获得性皮肤和软组织感染

RGM 引起最常见的感染是创伤后伤口感染。患者一般身体健康，药物诱导的免疫抑制很少引起 RGM 感染风险增高。由偶发分枝杆菌群引起的局部皮肤感染大约可占到 60%，而表 34-2 所列的 30 余种致病性 RGM 菌种任何一种均可引起相关疾病[1,18]。

创伤性伤口感染，尤其是开放性骨折，经常涉及以前的偶发分枝杆菌第三生物变种复合群(如猪分枝杆菌和休斯敦分枝杆菌)(表 34-1)[1,32]。据报道，在美国和澳大利亚昆士兰州立实验室分离的 85 株偶发分枝杆菌第三生物变种所致感染中，超过 75% 的感染与皮肤、软组织或骨感染有关[1]。大多数感染发生在穿刺伤或开放性骨折后 4～6 周。金属穿刺伤(48%)和机动车辆交通事故伤(26%)是最常见的先前伤，约 40% 的受伤部位是足或腿。踩到钉子上是最常见的情况。可惜这一系列分离株，并非通过上述鉴定偶发分枝杆菌第三生物变种复合群所用的分子生物学方法鉴定。一份疫情报告对 2003－2010 年美国得克萨斯一家大型的大学医疗中心涉及的猪分枝杆菌感染进行了统计，其中不仅包括多种呼吸道分离株，还有来自环境中水和冰的分离株，同时也包括来自局部脓肿(脊髓和椎旁部位、手指、颈部和胸部)、腹水、血液和(或)静脉置管部位的临床分离株[32]。

医疗手术或外科手术后(包括针刺注射)局部伤口感染的散发病例，可由龟分枝杆菌感染引起，但不如偶发分枝杆菌常见。近期发现，分馏 CO_2 激光美容贴可引起 RGM 感染[35]。

2003 年，一份关于苯扎氯铵(一种广泛使用的杀菌剂)污染及在得克萨斯州发生的由脓肿分枝杆菌引起的类固醇注射后关节感染的暴发的报告强调了常用消毒剂(包括杀菌剂、有机汞、氯、2% 甲醛和碱性戊二醛)对抗 RGM 活性的局限性[36]。

在 2011 年末和 2012 年初，在纽约暴发了 19 例由文身墨水引起的龟分枝杆菌感染[37]。这是有

记录以来由龟分枝杆菌引起的最大规模的暴发流行。创伤后伤口感染的临床表现可由局部蜂窝织炎或脓肿发展到骨髓炎[1]。2006 年，一份来自美国一所大型临床转诊中心的报告指出，从明尼苏达州、威斯康辛州、艾奥瓦州和南达科他州转诊的 63 例 HIV 阴性伴发 RGM 感染的患者中，由脓肿分枝杆菌或龟分枝杆菌导致的感染占 71%，由偶发分枝杆菌造成的感染占 29%。且龟分枝杆菌或脓肿分枝杆菌感染的患者通常存在多重(播散性)皮肤病变，而偶发分枝杆菌感染的患者仅有单个(局部性)病变。大多数偶发分枝杆菌感染的患者，其感染部位经受过穿透伤或进行过手术。而龟分枝杆菌或脓肿分枝杆菌感染者多为老年人，并且很可能在使用某些免疫抑制剂[38]。

2000 年初，一起由偶发分枝杆菌引起的下肢疖病(该病又被称为“足疗病”)的暴发流行被报道，32 个患者既往体健，他们均为加利福尼亚州一家美甲沙龙的老顾客[39]。从被污染的足浴盆，含毛发和其他碎屑的吸入滤网均培养出细菌，洗脚和修脚之前的刮腿，已被确定为一个危险因素[39]。其他菌种包括偶发分枝杆菌、脓肿分枝杆菌和玛格丽特分枝杆菌，随后在加利福尼亚州和佐治亚州的病例中被分离出来[1,40]，DNA 菌株分型结果表明来自足浴盆和患者的分离株结果完全相同。2004 年，从来自佐治亚州一家美甲沙龙的患者身上首次分离出 3 株产色素型菌株，即美容品分枝杆菌。而在委内瑞拉，一种不同类型的菌株在一名接受间充质疗法(mesotherapy)的肉芽肿患者中被发现。

第 6 组(玛格丽特分枝杆菌和沃林斯基分枝杆菌)和第 4 组的 RGM(耻垢分枝杆菌群，包括狭义的耻垢分枝杆菌和古德分枝杆菌)[41]，这 2 组细菌感染可见于创伤和外科或医疗手术后，如心脏手术、乳房缩小术和整形手术。蜂窝织炎和局部脓肿是最常见的临床表现[1,27,31]。

(二)播散性皮肤病

由于未知原因，播散性皮肤病中除了脓肿分枝杆菌/龟分枝杆菌群外，由其他 RGM 组引起的感染很少，即便是在免疫功能低下的患者中也是如此(包括 AIDS 患者)[1,31,42]。

相比较，由脓肿分枝杆菌(更少见)和龟分枝杆菌引起的播散性皮肤病则更常见和严重。在长期接受皮质类固醇的免疫抑制患者[器官移植、类风湿关节炎和(或)其他自身免疫病或免疫抑制治疗]中，其典型表现为多发性慢性痛性红色结节，通常累及下肢[38]，该疾病也没有明显的侵入门户。另外，与龟分枝杆菌一样，由脓肿分枝杆菌引起的播散性皮肤病很少有可检测到的菌血症和(或)心内膜炎，但是通常表现为多发性皮肤结节，多发生在下肢[1,31]。

随后这些病变部位的脓液会自行引流，引流的脓液一般抗酸染色阳性。由龟分枝杆菌所致的感染中，几乎所有的患者存在因长期使用低剂量皮质类固醇治疗所致的免疫抑制。尽管该疾病被推测为血行播散的结果，但在这种临床条件下很少发生菌血症，也没有明显的感染侵入门户[1,31]。据报道，从皮肤和软组织分离的 100 例菌株中，53%来自播散性皮肤感染的患者[1]。

最近报道了一种发生在泰国由 RGM 导致的罕见播散性感染，患者免疫功能正常而淋巴结肿大[43]。

(三)骨和关节感染

RGM 也可以造成骨和关节感染。与其他细菌感染一样，骨髓炎可能发生于开放性骨折、穿刺伤和其他来源的血行传播。其中最常见于股骨的开放性骨折，一般发生于骨科手术后。这种情况下，最常分离到的病原菌是偶发分枝杆菌群，包括最新报道的休斯敦分枝杆菌、伯尼克分枝杆菌和赛特分枝杆菌[1,18,44]。耻垢分枝杆菌群中最新报道的 2 种菌种古德分枝杆菌和沃林斯基分枝杆菌，也与骨髓炎有关[1,27]。继发于穿刺伤的骨组织受累可能是引起骨髓炎的第二大主要原因，最常见的感染致病菌是偶发分枝杆菌群[1]。也有文献报道了发生在假体膝关节的偶发分枝杆菌感染[44]，同样也有关于由 RGM 导致脊椎骨髓炎的报道[45]。

(四)肺部感染

1. 慢性肺部感染和支气管扩张 和播散性皮肤病一样，除了脓肿分枝杆菌复合群外，由 RGM 菌群引起的慢性肺部疾病很罕见[31]。RGM 引起的慢性肺部感染常见于不吸烟且患有支气管扩张的老年女性，该病有时也与鸟分枝杆菌复合群(MAC)感染有关。在 RGM 所致的肺部疾病病例

中，超过 80%的病原体是脓肿分枝杆菌[31]。

MAC 感染患者和脓肿分枝杆菌感染患者之间的相似性，可能与相同的致病性或宿主易感性等因素有关[31]。从呼吸道标本中多次培养出脓肿分枝杆菌通常对于肺部疾病的诊断有重要意义[31]。

2. 囊性纤维化 脓肿分枝杆菌脓肿亚种和马赛亚种在囊性纤维化（cystic fibrosis，CF）患者的呼吸道中越来越频繁地被检出[1,46-48]。一份 2012 年的研究报告提到脓肿分枝杆菌感染的 CF 患者较年轻，合并更多严重的并发症，且频繁静脉注射抗菌药物治疗[48]。脓肿分枝杆菌是在 CF 患者标本中分离到的第 2 种最常见的非结核分枝杆菌（仅次于 MAC），它也可能是与临床疾病相关的最常见菌种[46]。CF 患者除了慢性复发性气管和肺实质的感染外也会有支气管扩张，这些症状可能是 NTM 疾病易感性的首要危险因素[46]。支气管扩张，作为脓肿分枝杆菌感染很常见的危险因素，在脓肿分枝杆菌马赛亚种感染患者中却并不多见[49]。目前的研究表明，由于该菌种的 *erm* 基因无功能，先前的脓肿分枝杆菌马赛亚种感染的患者应用大环内酯类药物治疗通常是成功的（80%成功率，而脓肿分枝杆菌脓肿亚种感染患者大环内酯类药物治疗成功率仅为 25%）[49-50]。

目前，患有肺部疾病的普通人群脓肿分枝杆菌马赛亚种的地理分布存在明显差异，其具体原因尚不明确。最近数据显示，韩国的 150 个患者表现出比其他人群更高的患病率（55%），而美国国立卫生研究院的 40 例患者中患病率仅为 28%，荷兰 39 例分离株中该菌占 21%，法国 50 例 CF 患者的患病率为 22%，日本 102 例患者的患病率为 26%[49]。

2012 年报道了首例 NTM 可能人与人之间传播的病例，是 1 例 CF 和脓肿分枝杆菌马赛亚种感染的西雅图患者。对这一发现进行了进一步的调查，在美国以外的几个地方，包括英国和南美洲，发现了在基因上与该菌种相匹配的可能人与人之间传播的分离株，为这种不寻常的传播类型提供了初步的确证证据[10,47,51-52]。

3. 慢性吸入综合征 据报道在继发于潜在的胃食管疾病（如贲门失弛缓症）的慢性吸入综合征患者中，有近 1/2 患者的致病菌是偶发分枝杆菌[1,31]。偶发分枝杆菌引起的肺部疾病不伴有胃食管相关疾病的情况很罕见。有报道，少数肺部疾病可有龟分枝杆菌和耻垢分枝杆菌的感染，包括类脂性肺炎。

4. 其他肺部疾病 最近报道了一例罕见的玛格丽特分枝杆菌（*M. mageritense*）感染引起肺部疾病的患者，其免疫系统受损[1,53]。但是，上述所讨论的最近暴发的首例具有临床意义的猪分枝杆菌引起的肺部疾病与偶发分枝杆菌群的菌种有关[32]。

5. 过敏性肺炎 最近报道的由工业厂房内金属研磨机中被污染的金属加工液引起的过敏性肺炎与一种新的 RGM 菌种有关——免疫应答分枝杆菌（*M. immunogenum*）[1,31]。该菌来源于被污染的自动化支气管清洗机和金属加工液，已报道与该菌种相关的多次假暴发。该细菌能够在被降解的金属加工液中生长并存活，并且可以耐受用于金属加工液消毒的常规杀菌剂[1,31]。但是，在这些患者开放性肺活检的标本中尚未发现该菌种的存在。

（五）中枢神经系统疾病

由 RGM 引起的中枢神经系统疾病非常罕见，但是发病率和病死率非常高。大多数报道的病例与偶发分枝杆菌有关[1,54]。

截止到 2012 年，仅有 3 例由脓肿分枝杆菌群引起的中枢神经系统感染的病例报道。一份中国台湾发表的 8 例患者报道中，3 例为耳鼻喉科疾病，4 例为神经外科手术后疾病，1 例为播散性疾病。在幸存的患者中，所有的分离株都被确认为脓肿分枝杆菌马赛亚种。这是脓肿分枝杆菌马赛亚种关于中枢神经系统感染的首次报道[54]。

（六）角膜感染（角膜炎）

从眼部感染患者中分离出 RGM 的数量在过去 20 年内正不断增加。佛罗里达州一家眼科研究所的一项对 1982—1997 年期间所有 NTM 角膜炎病例的回顾性研究表明，24 例中有 19 例由 RGM 感染引起[55]。最近一项研究采用分子生物学方法对 113 例眼部分离菌株进行了鉴定，发现最常见的 RGM 是龟分枝杆菌（45%）、脓肿分枝杆菌（42%）和偶发分枝杆菌群（8%）[55]。

从 20 世纪 90 年代早期开始，就已出现其他与 RGM 相关的流行和散发眼部感染报道，包

括角膜移植术后感染和激光原位角膜磨削术(LASIK)后感染[1,55]。

(七)中耳炎

最常见的NTM耳疾病是由脓肿分枝杆菌引起的慢性中耳炎。1988年,在2家耳鼻喉诊所暴发了17例慢性中耳炎病例,患者表现为鼓膜穿孔和鼓膜置管术前的慢性耳部流脓[1]。在另一篇文献中,21例散发性慢性中耳炎患者(一些有乳突炎)中有20例是由耳管放置术后脓肿分枝杆菌感染引起的。从这些患者分离的菌株约1/2对氨基糖苷类耐药,原因系长期使用氨基糖苷类滴耳剂所致[1]。该疾病的散发流行一直存在,导致其发生的关键似乎是因异物的存在(鼓膜置管)。

目前,据报道由脓肿分枝杆菌马赛亚种引起的中耳炎和乳突炎发生于有耳部基础疾病的中年人,这些患者采用长达9个月疗程的克拉霉素成功治愈了疾病[56]。

(八)医疗保健相关的感染

尽管任何一种RGM均可引起医疗保健相关疾病,但是报道最常见的是偶发分枝杆菌、龟分枝杆菌、脓肿分枝杆菌和产黏液分枝杆菌。大多数感染发生于饮用污染的自来水后[1,57-58]。感染类型包括术后伤口感染、导管脓毒症、血液透析后感染、注射后脓肿、疫苗相关性暴发和鼓膜置管术后中耳炎[1,58]。这些感染既包括散发病例也含局部暴发。目前的暴发流行还涉及整容手术,如抽脂、脂肪塑形、针灸和间充质疗法(该过程包括多次以美容为目的的皮下药物注射或顺势疗法给药)[58-61]。

NTM伤口感染的暴发,特别是从美国前往国外接受去除脂肪组织整容手术的"脂游客"中发生的脓肿分枝杆菌的感染已经发生。从2003年到2004年,20例在多米尼加共和国接受腹部整形手术的美国游客在术后感染了脓肿分枝杆菌[59]。在同一诊所接受手术的8例患者具有相同的分离株。其他脓肿分枝杆菌的患者在不同的诊所进行手术,但其他患者的临床表现和人口统计学特征与以前的患者相似[59]。

生物疗法是一种用于疼痛管理和总体健康的治疗方法,也与龟分枝杆菌感染的暴发有关[62]。它结合了间充质疗法、类毒理法和针灸法,同时将口服顺势疗法的配方注射到身体的特定部位。

除了感染的真正暴发外,也有关于大量与卫生保健相关的假暴发的描述,涉及被污染或发生故障的设备,包括支气管镜、自动内镜清洗机和被污染的实验室试剂和冰[1,58,63]。

从2006年到2007年,巴西最大的腹腔镜术后相关流行病(超过150个分离株)与脓肿分枝杆菌马赛亚种的单一菌株有关。2008年以后,手术相关感染的报道有所减少,但在2010年,巴西不同地区报道了更多的感染病例。同样重要的是发现菌株对2%戊二醛消毒剂的抗性[64],Tiwari和同事在2003年在一些RGM菌株中强调了这一点[36]。

1. 导管相关性感染 中心导管相关性感染是最常见的由RGM引起医疗保健相关的感染[1,28,34],是RGM菌血症最常见的原因,但该疾病也可能通过局部伤口引流而造成出口或窦道感染[1,28,31]。其他类型的导管也可导致感染,包括腹腔导管、脑室-腹腔分流术导管和血液透析分流术导管[1]。最常见的RGM病原菌有产黏液分枝杆菌、偶发分枝杆菌、脓肿分枝杆菌和最新报道的菌血症分枝杆菌。在得克萨斯一家医院的肿瘤科病房中发生了由福西亚分枝杆菌和产黏液分枝杆菌导致的5位中心静脉置管患者的暴发感染[65]。这次暴发流行是福西亚分枝杆菌临床分离株在美国医院的首次报道。

2. 手术伤口感染 由RGM导致的手术伤口感染是一种公认的临床途径。在20世纪70年代和80年代,曾出现多种疾病的暴发流行,这些疾病通常与隆胸术和冠状动脉旁路移植术有关[1,58,66]。尽管在2002－2004年间巴西报道了12例由偶发分枝杆菌和猪分枝杆菌引起的隆胸术后手术部位的感染,但此类手术后感染现在并不常见[66]。然而,更多的情况下,这些感染现在发生在其他类型的整容手术(如抽脂)和其他类型的假肢手术(如膝关节置换术)之后。

在一份1989年的报道中指出[18],约80%的与心脏手术相关的RGM伤口分离株是来自7个南部沿海各州,包括得克萨斯州、路易斯安那州、佐治亚州、马里兰州、亚拉巴马州、佛罗里达州和南卡罗来纳州。同年发表的另一份报道指出在37例确诊的隆胸手术后伤口感染的患者中,有92%的患者也是来自南部沿海各州,大多数位于得克

萨斯州、佛罗里达州和北卡罗来纳州。上述结果表明，该疾病的发病风险在美国东南部最高[1]。

在巴西、多米尼加共和国和韩国已经报道了在暴发的腹腔镜手术和整容手术后感染标本中，分离到脓肿分枝杆菌的 2 种亚种[58-59,61]。结合其他最近的报道表明，虽然很少有研究在侵袭性感染中发现这些较新的亚种，但在既往的研究中它们被错误地分类了[67]。

2013—2014 年在美国东南部一家三级保健医院暴发了由脓肿分枝杆菌导致肺移植患者术后的感染，在患者护理中采取了多种干预措施，包括使用饮用无菌水、口腔护理、洗浴并将供水系统进行完善，使得暴发得到缓解。通过脉冲场凝胶电泳(PFGE)对临床分离株进行分子分型，鉴定出 2 株脓肿分枝杆菌克隆株，其中一株是从新医疗大楼的医院供水系统中分离得到的[68]。

2014 年一个独立教学医疗中心报道了六例由沃林斯基分枝杆菌引起的心胸外科术后感染。没有明确的单一感染源或环境感染源，但胸外科手术中使用的独立加热/制冷设备和冷空气爆冷器被怀疑是潜在的感染源。将这些设备移除后，暴发停止了[69]。在法国也发生了一起类似的暴发，对此进行了深入调查且实施了特殊的感染控制措施[70]。

3. 假体感染　也有关于假体装置(包括人工心脏瓣膜、人工膝关节和髋关节，晶状体植入物和骨折后金属杆植入脊椎以固定骨折后的骨)植入后的感染的报道[1,44]。最常见的病原菌仍是偶发分枝杆菌，但是包括耻垢分枝杆菌群在内的任何一种致病性的 RGM 都可能与这类感染有关[1]。

三、标本的采集、运输和储存

标准方法的详细内容见第 31 章。菌种的运输需要使用防漏的容器，并采取适当的安全措施来完成。进行 RGM 检测的标本应当按照合适的运输方法和处理规程将生物或传染性物质及时送达实验室[71]。

四、直接检测

(一)显微镜检查

分枝杆菌涂片镜检是一种快速且相当敏感的诊断 RGM 感染的方法。革兰染色呈微弱着色，“鬼样(ghost-like)”串珠状革兰阳性杆菌常有助于分枝杆菌病的诊断。萋-尼(齐-内；Ziehl-Neelsen)染色或金永改良抗酸染色(Kinyoun)也可能有帮助。但是，仅用涂片方法不足以进行菌种的鉴定。一项大型研究发现，包括 RGM 在内的 NTM 可通过对标本进行荧光染色检测出来，特别是来自肺部疾病流行地区 AIDS 低风险患者的标本[71-72]。染色的具体操作方法见第 31 章。

(二)核酸检测

目前，尚无可用于直接检测 NTM 的商业核酸检测系统。一种间接的方法是针对抗酸涂片阳性的标本，若其结核分枝杆菌特异性的核酸扩增试验结果是阴性，则认为存在 NTM，但是无法区分是 RGM 还是慢生长 NTM。

(三)实验室开发性检测

已开发出一种有融合曲线分析的实时 PCR 分析方法，该方法可以持续检测和区分结核分枝杆菌和 NTM。在 2003 年的一项研究中，先前被鉴定为偶发分枝杆菌的 20 个分离株被确认为偶发分枝杆菌[73]。此外，一项使用全基因组分析和生物信息学来识别分子靶点的单步多重 PCR 检测方法已被用于检测 5 种具有临床意义的 NTM 菌种，包括脓肿分枝杆菌脓肿亚种、脓肿分枝杆菌马赛亚种[74]。这些方法目前只能在研究或大型参考实验室中使用。

五、细菌分离方法

RGM 的初次分离培养的最佳温度应该是 28～30℃，而不是 35℃，尤其是龟分枝杆菌和免疫应答分枝杆菌[1]。直接检测和分离方法详见第 31 章。

常规血培养系统中 RGM 的分离似乎是没有问题的，但是迄今尚无针对商品化系统的大型比较性研究。

六、鉴定

(一)生化试验

正如前面所说的，RGM 被定义为在 7 天内生

长的 NTM(大多数在 3～4 天)[1]。在先进的分子生物学技术应用之前,RGM 传统的实验室鉴定方法主要基于生长速率、产色素情况、菌落形态和选定的系列生物化学试验[1]。这些标准化的生化试验包括芳基硫酸酯酶生成试验、5%氯化钠耐受试验、硝酸还原酶活性、铁吸收试验和碳水化合物利用试验。所有的偶发分枝杆菌群和龟分枝杆菌/脓肿分枝杆菌群在 3 天内表现出强阳性的芳基硫酸酯酶反应。耻垢分枝杆菌群(耻垢分枝杆菌和古德分枝杆菌)和沃林斯基分枝杆菌生长速度相同但是在 3 天内不表现出芳香基硫酸酯酶活性[1,27]。约 95%的耻垢分枝杆菌(狭义的)和 80%的古德分枝杆菌分离株可迟缓(7～10 天)产黄-橙色色素[1,27]。

目前,对于临床实验室的建议是,RGM 的生物化学试验应当被分子生物学和蛋白质组学方法(测序或 MALDI-TOF MS)所取代。另外,只有在描述一种新的菌种时,作为一种多向鉴定法的一部分才应当进行生化试验。

(二)抗菌药物敏感试验用于分类鉴定

其他辅助性非分子生物学检测方法,包括抗菌药物敏感试验,也可用于 RGM 的初步鉴定[1,75]。目前随着分子技术的到来,已经很少使用该方法,但它结合分子生物学和蛋白质组学检测结果可以进行菌种的确认。作为一种筛选工具,偶发分枝杆菌群和龟分枝杆菌/脓肿分枝杆菌群分离株可采用多黏菌素 B(300 U)纸片扩散法进行区分。一般来说,偶发分枝杆菌群分离株表现出在多黏菌素 B 纸片周围部分或清晰的抑菌圈(≥10 mm),龟分枝杆菌/脓肿分枝杆菌群分离株则没有抑菌圈[1]。

此外,龟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌也有不同的抗菌药物敏感模式。2 个菌种之间主要区别之一是对头孢西丁的耐药性。通过琼脂纸片扩散试验,龟分枝杆菌表现出对头孢西丁的完全耐药,没有局部或完整的抑菌圈,而脓肿分枝杆菌则可看到部分或完整的抑菌圈。一般龟分枝杆菌分离株对头孢西丁的 MIC≥256 μg/ml,而脓肿分枝杆菌分离株的模式 MIC 为 32～64 μg/ml[1]。且目前的研究表明,脓肿分枝杆菌脓肿亚种,而非龟分枝杆菌或脓肿分枝杆菌马赛亚种分离株,存在一种与偶发分枝杆菌相似的诱导型 *erm* 基因,它可表达对大环内酯类药物的耐药性[76-77]。

脓肿分枝杆菌分离株对阿米卡星的 MIC 也较低,且对妥布霉素耐药,而龟分枝杆菌对妥布霉素比阿米卡星更敏感(active)。另外,在体外试验中,龟分枝杆菌分离株比脓肿分枝杆菌分离株对某些较新的抗生素如利奈唑胺和莫西沙星更敏感[78]。

仍然需要强调的是,尽管上述检测是有帮助的,但分子生物学或蛋白质组学对于包括 RGM 在内的所有 NTM 的最终鉴定是必不可少的[75]。

(三)HPLC 鉴定

对分枝杆菌细胞壁分枝菌酸成分的 HPLC 分析已被常规用于大型参考实验室或州立卫生部门实验室对慢生长 NTM 分离株的鉴定,但它对于 RGM 的鉴定一直是存在问题的[1,79]。HPLC 可以将 RGM 分离株划分到组或复合群,但是它的特异性不高。因此,不能很准确地鉴定大多数菌种。

(四)分子生物学鉴定方法

1. 核酸探针技术 INNO-LiPA 多重探针分析(Innogenetics,Ghent,Belgium)是基于反向杂交的原理[80]。尽管该方法尚未获得美国 FDA 的许可,但它能鉴定快生长和慢生长的分枝杆菌菌种。该方法采用 PCR 技术扩增 16S～23S 内部转录间隔区(internal transcribed spacer,ITS)获得生物素化的 DNA,然后与固定在膜条上的平行的特定的寡核苷酸探针杂交。该系统的主要优势在于可一次性检测多种菌种,而无须为每个菌种选择一种合适的探针。其不足之处在于,在偶发分枝杆菌群和其他临床罕见菌种(如抗热分枝杆菌、田野分枝杆菌和蜂房分枝杆菌)之间可能存在的交叉反应[1,80]。而且,它不能鉴别亲缘关系较近菌种的分离株,如龟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌[80]。然而,自从 INNO-LiPA 最初的研究开始,该系统就一直在改进,包括增加了一些可检测偶发-外来分枝杆菌群和耻垢分枝杆菌的探针。

另一个针对 23S rRNA 基因的类似商品化 PCR 方法是 GenoType 分枝杆菌检测法(Hain Lifescience,GmbH,Nehren,Germany),该方法提供了同时鉴定龟分枝杆菌的探针和针对外来分枝杆菌、偶发分枝杆菌和草分枝杆菌的特异性探针。

以上这两种系统均在欧洲广泛用于 NTM 的鉴定[81-82]。

2. 序列分析 核酸序列分析已用于分枝杆菌的鉴定。这种鉴定工具有助于区别大多数新发现的 RGM 菌种[33,83-84]。

3. 部分 16S rRNA 基因序列分析 一般来说，包括 RGM 在内的分枝杆菌的鉴定主要集中在 16S rRNA 基因的 5′端 2 个主要的高变区：A 区和 B 区，这些区域分别对应于大肠埃希菌的 129～267 位和 430～500 位。尤其是高变区 A 包含了分枝杆菌中大多数菌种特异性的序列变异（即所谓的“标识序列”），对该区域的测序可对大多数分枝杆菌进行分类鉴定，包括许多 RGM 菌种[2,33]。

尽管美国 FDA 尚未批准，但一种商用的基因测序系统 MicroSeq 500 16S rDNA 细菌测序试剂盒（Life Technologies，Foster City，CA），可分析前 500 bp 序列，并将其与商业数据库中的序列进行比较。仅采用该商用系统不能区分某些主要的 RGM 菌种，如龟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌，它们的鉴定还需要进行其他区域或其他基因的测序[75,83,84]。为此，临床实验室已经从他们自己内部的图书馆或 GenBank 中将其他序列补充入商用数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank）。

目前，市售的部分 16S rRNA 基因测序系统（MicroSeq“first 500 bp”）在进行 RGM 的鉴定时存在一些大的缺陷。例如，RGM 中 2 种主要的致病性分离株（龟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌）需要测序的部位在前 500 bp 之外，因为它们在该区域相同而在 16S rRNA 基因的其他部位（3′区）不同[33,83]（表 34-3）。为了确保鉴定结果的准确性，在参考序列和查询序列之间至少应该比较 300 bp 的高质量序列，并且应涵盖一个预期会发生基因变异的区域。因此，目前大多数实验室测序长度为 450～480 bp，以便于提供一段足够长度的序列[33,85]。

表 34-3 常见临床意义重大的前 500bp 序列具有相同 16S rRNA 基因的无色素性 RGM 菌种

菌种	由 *rpoB* 基因序列分离
脓肿分枝杆菌脓肿亚种、龟分枝杆菌	
脓肿分枝杆菌马赛亚种、富兰克林分枝杆菌、脓肿分枝杆菌博氏亚种	是
塞内加尔分枝杆菌，设计分枝杆菌[a]	
休斯敦分枝杆菌、外来分枝杆菌、产鼻疽分枝杆菌[c]	是[b]
产黏液分枝杆菌，福西亚分枝杆菌	是
外来分枝杆菌，败血症分枝杆菌	是

注：[a] 通过全基因测序，已确定设计分枝杆菌与塞内加尔分枝杆菌属同一菌种[102]；[b] 当基因发生转移的时候少有例外；[c] 产鼻疽分枝杆菌是一种慢生长分枝杆菌，不是 RGM[102]

一般来说，分枝杆菌属的成员相互间的亲缘性都很近，某些亲缘关系非常近的菌种之间可能仅有几个碱基的差别，或根本没有差异。例如，古德分枝杆菌是在表型上除了药敏模式外，很难与耻垢分枝杆菌进行区别，两者在整个 16S rRNA 基因中仅有 4 个碱基的差异[27]。

一个有质量保证的数据库对于未知菌株的评估和准确鉴定是必不可少的[84]。实验室工作人员也应当认识到序列分析是鉴定未知菌株的多相途径中一个重要的组成部分。尽管在某些情况下，对于细菌的鉴定无须常规检测，仅通过分子生物学的方法鉴定可能就已经足够，但是在大多数情况下，必须从更广泛的视角进行综合审查。一些研究者认为，包括菌落形态、产色素情况和生长速率在内的关键的表型试验对于细菌的鉴定都是必要的，尤其是对亲缘关系非常近的菌种的鉴别[75,84]。

对报告标准和临界值缺少共识一直是序列数据解释中一个主要障碍[84-85]。不同的报告标准，如不同菌种、与某菌种相关的菌种及与某种菌种密切相关的菌种的报告标准，依赖于未知分离株与 16S rRNA 基因数据库条目之间序列差异的数量[86]，目前已有推荐的标准但尚未经验证[33,84]。

2008 年的 CLSI MM18-A[85] 文件建议将 16S rRNA 基因测序用于分枝杆菌鉴定的指南，以便以一致、实用的方式鉴定分枝杆菌。对于序列概

率100%的结果，则可以确定其属和种；若序列概率为99.0%～99.9%，文件推荐可报告为“属，与某个种密切相关”；若95%≤序列概率≤98.9%，实验室应当考虑报告“16S rRNA基因测序不能明确鉴定，与某种分枝杆菌关系最紧密”[85]。尽管达到100%的一致性对于标识序列是硬性要求，但在其他位置一个或几个碱基的错配对于种属水平的鉴定是可以接受的[85]。

对于常规实验室来说，测序仍然是一种复杂、通常成本高昂的检测项目，另外实验室也可能没有足够量的分离株能够保证测序的进行。因此，专家共识认为并非所有的实验室都应尝试把测序作为实验室的常规项目。此外，共识还要求应将测序的标本送到具有该技术方法和经验的合格的参考实验室[84-85]。

4. *hsp65*基因测序 尽管65kDa的热休克蛋白基因(*hsp*65)在分枝杆菌菌种呈高度保守，但是与16S rRNA基因序列相比，*hsp*65基因表现出更多的种间和种内的多态性[87,88]。这种变异性有利于研发其他策略用于鉴定有遗传相关性的RGM菌种[87]。大多数测序和限制性片段长度多态性分析都使用由Telenti等确认的一段441 bp的序列[88]，通常被称为Telenti片段。

基于DNA测序的研究表明RGM菌种之间存在等位基因的多态性。对于RGM的一些菌种(包括外来分枝杆菌、猪分枝杆菌、塞内加尔分枝杆菌、龟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌)的进一步研究表明，每个菌种间存在4～6个序列变异体、在441bp Telenti片段内有4～6个核苷酸不同[88-89]。

此外，与16S rRNA基因测序不同，*hsp*65测序方法能够区分脓肿分枝杆菌分离株和龟分枝杆菌分离株(它们在441 bp *hsp*65序列中有几乎30 bp的差异，而在整个的1500bp 16S rRNA基因序列中仅有4 bp的差异)[89]。与16S rRNA基因测序相比，*hsp*65基因测序甚至可以区分16S rRNA基因高度相似的RGM菌种，如偶发分枝杆菌、败血症分枝杆菌、外来分枝杆菌、休斯敦分枝杆菌和塞内加尔分枝杆菌。和其他测序方法一样，*hsp*65测序的不足在于数据库中几乎没有新的RGM菌种序列。较旧的菌种(即多个菌株)未曾进行详细的测序，因而每种菌株通常只有一段序列是可用的。因此，开发一种更全面的数据库和室内验证都至关重要[2,84,89]。

5. *rpoB*序列分析 用*rpoB*(该基因编码RNA聚合酶β亚基)测序来描述菌种的初始研究是基于*rpoB*基因的部分序列分析，该段序列约占整个基因全长的20%。其他研究者建议选择一段340～360 bp的区域进行RGM菌种的鉴定是可行的，但是随着广泛变异的发现，可能需要研发更多具有菌种特异性的探针[23-24,90-91]。

Adekambi和Drancourt在2004年的一项研究中强调了*rpoB*的实用性，该研究比较了19种RGM菌株(包括该群中主要的致病性菌株)系统发育关系，并通过将*rpoB*与一些不同的靶点序列(包括16S rRNA基因、*hsp*65、*sodA*和*recA*)进行比较，比较了19种RGM菌株(包括该群中主要的致病性菌株)之间的系统发育关系，19种菌种*rpoB*基因均表现出良好的鉴别能力[92-93]。*rpoB*序列不仅可用于已被确认菌种的鉴定，也有助于鉴别不能单独用16S rRNA基因或*hsp*65序列分析进行区分的菌种。新报道的菌种通常也能通过*rpoB*测序进行鉴别，包括脓肿分枝杆菌马赛亚种、福西亚分枝杆菌和欧巴涅分枝杆菌[23-25]。但是，目前研究表明多位点测序对于脓肿分枝杆菌马赛亚种的鉴定是必要的[8,22,94]。

6. 其他基因靶点的序列分析 用于分类鉴定的其他分子靶点包括32 kDa蛋白质基因、超氧化物歧化酶基因(*sodA*)、16S～23S rRNA ITS、*dnaJ*、*secA1*和*recA*，可针对这些靶点采用PCR限制性片段长度分析(PCR-restriction fragment length analysis，PRA)或直接测序的方法对分枝杆菌进行鉴定[94-95]。但是，初步数据表明，这些基因序列比*hsp*65更容易变异。所以直到今天，这些方法还是很少用于RGM菌种的实验室鉴定[24,94-95]。

此外，所有基于序列的检测一个最重要的缺陷就是缺乏足够的数据库[24,75,84]。多基因方法被研究者广泛建议用于菌种的分类评价，目前该方法也被一个特别委员会提出用于细菌学菌种确定的再评估[96]。

近来，Kim等采用*erm*基因[41]测序来鉴别脓肿分枝杆菌马赛亚种、脓肿亚种和博氏亚种[97]。采用*erm*基因[41]的鉴定结果与包括*rpoB*、*hsp65*、*sodA*和16S～23S ITS在内的多位点序列分析结果一致[97]。但是，Blauwendraat等报道*sodA*测序对菌种鉴别几乎没有价值[98]。表34-4

展示了一些常见的 RGM 病原体的 *erm* 标志基因。

表 34-4　常见 RGM 菌种的 *erm* 标志基因

标志	菌种
erm 基因	
erm(38)	耻垢分枝杆菌
erm(39)	偶发分枝杆菌
erm(40)	玛格丽特分枝杆菌、休斯敦分枝杆菌
erm(41)	脓肿分枝杆菌
缺少 *erm* 基因或 *erm* 基因无功能	龟分枝杆菌、产黏液分枝杆菌复合群(产黏液分枝杆菌、福西亚分枝杆菌、欧巴涅分枝杆菌)、塞内加尔分枝杆菌、外来分枝杆菌、脓肿分枝杆菌马赛亚种、约 20%的脓肿分枝杆菌脓肿亚种

7. 多位点序列分析　Macheras 等在 2009 年的一项研究表明，单位点测序不能准确地鉴别脓肿分枝杆菌复合群(即脓肿分枝杆菌脓肿亚种、先前的马赛分枝杆菌和博氏分枝杆菌)[99]。以前采用 *rpoB* 测序的方法鉴别脓肿分枝杆菌复合群中的菌种，由于复杂的基因结构，该方法似乎并不理想。在迄今研究的大量脓肿分枝杆菌复合群分离株中，该群成员之间的基因交换导致同源管家基因中发生合理的基因重组事件[94,99-100]。

这些研究也强调了在菌种确定过程中多基因测序的必要性[99]。Macheras 等在一项 2011 年的研究中提出了应用 8 种管家基因序列(4071 bp)，包括 *argH*、*cya*、*glpK*、*gnd*、*murC*、*pgm*、*pta* 和 *purH*[101]。他们的工作也对以往的基于 2 种 RGM 菌株间 *rpoB* 序列差异>3%的菌种鉴别标准提出质疑[101]。此外，他们的工作也证实了后来的研究，即马赛分枝杆菌和博氏分枝杆菌并非不同的菌种[8,102]。

8. PCR-限制性酶切分析　*hsp*65 的 PRA 曾被认为是一种有价值的 RGM 鉴定工具。目前，*hsp*65 的 441 bp Telenti 片段仍然是 RGM 的 PRA 鉴定最有用的序列，尽管尚未对该序列用于产色素 RGM、新菌种、RGM 亚种(如福西亚分枝杆菌、欧巴涅分枝杆菌和脓肿分枝杆菌马赛亚种)和其他菌种的鉴定进行广泛评估[1,88-89]。因此，PRA 方法通常被更广泛的基因测序所取代。

9. 可变数目串联重复序列(VNTR)分析　近来，Choi 及其同事以可变数目串联重复序列 11 (VNTR11)和 VNTR23 作为靶点将 85 株脓肿分枝杆菌复合群(脓肿分枝杆菌脓肿亚种、脓肿分枝杆菌马赛亚种和脓肿分枝杆菌博氏亚种)分离株鉴定到种[103]。该方法也可将脓肿分枝杆菌复合群和其他分枝杆菌菌种(包括偶发分枝杆菌和龟分枝杆菌)区别开来，85 株菌株的鉴定结果完全一致。VNTR11 在脓肿分枝杆菌中表现出 2～4 个拷贝(179～278 bp)的多态性，而脓肿分枝杆菌马赛亚种和脓肿分枝杆菌博氏亚种仅有 1 个拷贝的多态性。VNTR23 在脓肿分枝杆菌中表现出 1～3 个拷贝(196～238 bp)的多态性，在脓肿分枝杆菌博氏亚种中有 2 个拷贝的多态性，而在脓肿分枝杆菌马赛亚种分离株中则为阴性[103]。

10. 焦磷酸测序　焦磷酸测序技术(Biotage, Uppsala, Sweden)是基于 DNA 合成过程中焦磷酸的检测，在测序过程中，可见光的产生与参加反应的核苷酸数目成正比。

该方法使用短的(20～30 bp)序列，其不如传统的 Sanger 测序辨识力高，是它是一种有吸引力的更便宜的替代方法。焦磷酸测序技术的另一个优点是它的商业可用性，尽管它还没有得到美国 FDA 的批准。和其他的测序方法一样，它最主要的局限取决于用于序列解释和比较的数据库的质量[104]。在最近一项对 50 株 RGM 分离株(龟分枝杆菌/脓肿分枝杆菌和产黏液分枝杆菌)进行焦磷酸测序的研究中发现，与传统测序结果相比，鉴定结果一致的有 40 例，10 株偶发分枝杆菌中，3 例与偶发分枝杆菌/外来分枝杆菌的序列匹配结果一致，剩下的 7 例则与偶发分枝杆菌序列相匹配[105]。迄今为止，该方法已能够快速、准确地鉴定各种 RGM 菌种[105]。

近日，有研究者提出应用 *rpoB* 基因片段结合焦磷酸测序来确定一段 60 bp 的 *rpoB* 基因序列。根据 Adekambi 等[23]的编号方式，认为该序列位于可变区Ⅱ的 1105～1219 位(包括引物序列)，并且已经成功鉴定了 99/100 株(100 株菌株鉴定出 99 株，下同)脓肿分枝杆菌与龟分枝杆菌的分离株[106]。

11. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术　近年来，基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)技术已被证明是鉴定包括 RGM 在内的

NTM 的一种可靠和快速(包括提取过程,约 30 min 就能完成大多数 RGM 菌种的鉴定)的新技术。MALDI-TOF MS 技术基于所提取的蛋白质可以产生出独特的指纹图谱。与基因测序方法相比,MALDI-TOF MS 更便宜且更省力[107]。最近有研究表明,联合应用 MALDI-TOF MS、定制的增强库和提取程序,能够区分一些临床相关的 RGM,包括龟分枝杆菌、脓肿分枝杆菌复合群,但是不能将脓肿分枝杆菌脓肿亚种与脓肿分枝杆菌博氏亚种或脓肿分枝杆菌马赛亚种区分开来[107-109]。免疫应答分枝杆菌也被错误地鉴定为脓肿分枝杆菌,同时本方法还不能区分产黏液分枝杆菌和福西亚分枝杆菌。只有少数研究者使用 MALDI-TOF 技术对液体培养基中的 RGM 进行了检测。Lotz 和他的同事们报道称,来自液体培养基的菌株 6/8 株被正确鉴定为偶发分枝杆菌,8/8 株被鉴定为产黏液分枝杆菌,6/7 株被鉴定为外来分枝杆菌;而来自固体培养基的菌株 25/26 株被正确鉴定为龟分枝杆菌,25/26 株为偶发分枝杆菌,13/16 株被正确鉴定为外来分枝杆菌,19/20 株被鉴定为产黏液分枝杆菌[108]。其他最新发表的文献也说明了在液体培养基中偶发分枝杆菌、古德分枝杆菌以及产黏液分枝杆菌群的菌种鉴定问题[110-111]。据报道,对于慢生长和快生长分枝杆菌菌种达到种水平的总体鉴定率约为 95%,这取决于所采用方法的差异,包括处理、提取、使用系统的类型和制造商的数据库是否增加了内部库[109-111]。

目前,两种主要的商业 MALDI-TOF MS 系统是 Bruker Biotyper(Bruker Daltonics,Billerica,MA)和 bioMérieux Vitek MS(bioMerieux,Durham,NC)系统[109,112]。目前的系统包含光谱数据库和鉴定算法,可以在全细胞质谱中探测出保守和特定微生物的峰值模式[113]。在分枝杆菌菌种鉴定过程中,目前最耗时的部分是灭活和提取过程,但是与最初的过程相比已经有所缩短[114-115]。尽管 MALDI-TOF MS 技术已经可以鉴定 RGM 的多个菌种,但是此方法仍然不足以对 RGM 中亲缘关系较近的菌种进行鉴别,如脓肿分枝杆菌脓肿亚种与脓肿分枝杆菌马赛亚种,以及产黏液分枝杆菌与福西亚分枝杆菌[114]。2 家商用 MALDI-TOF MS 制造商,目前都正在修订、扩展和更新他们的微生物数据库。

和基因测序法一样,扩展 MALDI-TOF MS 数据库的重要性,怎么强调都不为过[115]。目前,大多数用户正在用他们自己内部研发的数据库来补充现有的商业数据库,以便能够在种水平鉴别更多的 NTM 菌种[114]。

对 MALDI-TOF MS 技术未来的改进建议包括数据库的细化,以便能够识别更多额外的菌种和可能的亚种,并能够提供更加准确的菌种鉴定,微生物可能的分型,对毒力和抗菌药物耐药性相关的特异性蛋白的存在或缺失的检测,以及从临床标本直接检测和鉴定方法的研发[113]。

七、分型系统

(一)脉冲场凝胶电泳

脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis,PFGE)是应用最广泛的 RGM 菌株分子分型方法。尽管 PFGE 对于 RGM 的分型一直没有被标准化,但是大多数研究者一致认为分离株之间小的差异(2 或 3 条带)表明分离株之间亲缘关系很近,4~6 条带的差异则认为菌株之间可能有相关性,当差异≥7 条带时,表明分离株之间存在遗传学的差异[19,116]。由于大多数无相关性的 RGM 菌株含有高度多样化的 PFGE 型别,故该技术已被用于流行病学调查。随着硫脲的加入作为初始方法的改进,现在对 RGM 的所有菌株进行 PFGE 可获得可靠的结果,包括以前受 DNA 降解影响的分离株[117-118]。最近的研究表明,以往分离株 DNA 拖尾模式与 *dnd*(一种 DNA 降解基因)的存在有关[119]。

(二)随机扩增多态性 DNA PCR

随机扩增多态性 DNA PCR(random amplified polymorphic DNA PCR,RAPD-PCR)法,采用任意一段引物和低严格性条件,引物以部分匹配或完全匹配的方式杂交于 2 股 DNA 模板,最终产生菌株特异性的异质性 DNA 产物。Zhang 和同事采用 RAPD-PCR 或任意引物 PCR 的方法比较脓肿分枝杆菌菌株[117]。他们证实了一些以前医院内 RGM 暴发流行的结果,包括 1988 年由对氨基糖苷类耐药的脓肿分枝杆菌导致的鼓膜置管术后儿童中耳炎的流行,以及心脏手术后的暴发流行[1,58,117]。

(三)VNTR 分析

VNTR 菌株分型方法的发展有助于解释慢性新发感染和复发感染的分离株之间的区别。Blauwendraat 及其同事的研究也表明，该方法可说明是否发生交叉感染，并且可前瞻性研究脓肿分枝杆菌复合群菌株和临床结果之间的关系[98]。目前，Wong 等[120]描述了一种采用脓肿分枝杆菌基因组序列的 18 个串联重复序列进行 VNTR 分型的方法(MavA)，发现该方法优于多位点测序，其分型能力、位点稳定性和重现性均为 100%。

(四)基于重复序列的 PCR

一种商品化的 DiversiLab 系统(bioMerieux，Durham，NC)通过利用散布在基因组中的重复元件(虽然尚未获得美国 FDA 批准)，对包括分枝杆菌在内的微生物菌株进行分型。该系统通过电泳技术将微流体芯片上的基于重复序列的 PCR 扩增产物分开，最终通过电脑软件进行结果判读。据报道该方法对于一些分枝杆菌菌种的分辨能力等同于甚至超过标准的限制性片段长度多态性分析，并且比标准的 PFGE 所用的标本量更少，所需时间也更短[94,121]。该系统的局限性包括缺乏广泛建立的数据库和系统的成本。

(五)肠杆菌基因间重复共有序列 PCR(ERIC PCR)

肠杆菌重复共有序列是分布在细菌染色体上的重复元件，位于多顺反操纵子基因间区域或两侧可读框。最近用脓肿分枝杆菌/龟分枝杆菌复合群分离株和偶发分枝杆菌分离株对该方法进行了评价。分枝杆菌的 ERIC PCR 分型等同 RAPD-PCR，因为 ERIC 重复序列从未在分枝杆菌基因组中被证实存在，在缺乏真正的 ERIC 序列的情况下，可用适当的 ERIC 引物进行扩增。在一项针对发生在巴西的脓肿分枝杆菌暴发菌株的研究中，对那些经硫脲处理后仍表现出拖尾的菌株进行分型，ERIC PCR 表现出比 PFGE 更高的分辨能力，尽管该方法对偶发分枝杆菌不具分辨能力[66]。

(六)全基因组测序(WGS)

全基因组测序(whole-genome sequencing，WGS)是近年来出现的一种专门用来研究遗传变异和进行种群研究的方法。该方法能够识别多个可能与抗药性、毒力和(或)寄主关系相关的遗传区域。WGS 还有助于我们理解菌株的特定遗传决定因素和整体相关性。重要的是，WGS 最近首次提供了脓肿分枝杆菌马赛亚种在人与人之间传播的证据[51-52,122]。尽管 WGS 还不是很普及，并且需要专业的知识对数据进行解释，但是其正在成为研究包括 RGM 在内的 NTM 的重要工具。"克隆性"和观察到的异质性因物种而异，因此不太可能有一个共同的鉴定标准。目前，也仅在少数的 RGM 中(即脓肿分枝杆菌复合群)进行了基于人群的研究。

八、血清学试验

分枝杆菌的血清学分类开始于 1925 年，最初是对鸟分枝杆菌复合群的分类。但是，血清分型已经不适用于对包括 RGM 在内的分枝杆菌的常规菌种鉴定。早期研究充分阐述了分枝杆菌抗原组成的复杂性，而且许多抗原可存在于多种菌种中[123]。

九、抗菌药物敏感性试验

临床上 RGM 的药敏性试验采用几种不同的方法。这些方法包括琼脂纸片扩散法、肉汤微量稀释法、琼脂稀释法和 Etest。每种方法都被证实是有用的，但是没有哪一种方法被很好地标准化，直到 2003 年美国临床和实验室标准协会指南公布[124]。在 M24A 文件中，CLSI 推荐将肉汤微量稀释法作为 RGM 药敏试验的参考方法[125]。9 种抗生素包括阿米卡星、头孢西丁、环丙沙星、克拉霉素、多西环素、利奈唑胺、亚胺培南、磺胺甲噁唑和妥布霉素被推荐进行药敏试验，并且这些药物的折点也已被确定。目前，暂行的 CLSI 指南包括一些附加的药物，如莫西沙星、美罗培南、米诺环素，甲氧苄啶-磺胺甲噁唑也已被纳入其中[125]。此外，还有一项 CLSI 提案建议将替加环素 MIC 包括进来而未进行解释，因为目前还没有针对该药物的标准折点。

另外，亚胺培南的中介折点从 8 μg/ml 变为

8～16 μg/ml，使这种药物可以报告用于之前并不推荐的脓肿分枝杆菌和龟分枝杆菌分离株[125]。

简单来说，微量肉汤稀释法是采用 MH (Mueller-Hinton)肉汤对药物进行连续 2 倍的倍比稀释。菌悬液配制浓度为标准的 0.5 麦氏浊度，然后将菌悬液稀释到浓度约为 10^6 CFU/ml，取稀释后的菌悬液 100 μl 分别加到 16 孔微量滴定板的板孔中，最终浓度约为 10^4 CFU/孔[125]。最后 30℃孵育 3 天读取最佳的 MIC。几种 RGM 菌种(包括偶发分枝杆菌群内的一些菌种)可在 48 h 读取结果，但是大多数临床相关的菌种(包括脓肿分枝杆菌/龟分枝杆菌复合群)需要 3～5 天的生长期。由于药物可能发生降解，CLSI 建议 5 天后不要报告[125]。

关于药敏试验结果的一些特定建议也已制定。妥布霉素应当仅对龟分枝杆菌分离株报告。任何一种阿米卡星 MIC 值≥64 μg/ml 的 RGM 分离株应当重新检测和(或)送到参考实验室确认其耐药性(尽管涉及 16S rRNA 基因突变的耐药性确实已经出现)。如果任何偶发分枝杆菌群分离株对亚胺培南的 MIC>8 μg/ml，也应当重新检测并密切注意接种浓度，由于亚胺培南随时间的不稳定性，故最长培养 3 天。

另外一个注意事项是磺胺甲噁唑和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑的 MIC 值的判读标准是以 80%的生长抑制作为药敏终点，而非其他抗菌药物所采用的药敏终点为 100%抑制。磺胺类药物 MIC 板的过量接种往往最明显。一个无经验的实验室工作人员可能会把实际上接种量太多的孔解释为磺胺类药物 MIC 耐药。偶发分枝杆菌群分离株很少对磺胺类药物耐药，如果发现该群一份分离株耐药，有必要以较低的接种量重新进行检测[125]。

近年来，在许多偶发分枝杆菌群分离株、脓肿分枝杆菌脓肿亚种中发现存在功能性 *erm* 基因，而龟分枝杆菌或脓肿分枝杆菌马赛亚种则无此基因。该基因可诱导大环内酯类耐药。这一发现已改变了克拉霉素药敏的报告方式[76-77,126-127]。克拉霉素应该在最初 3 天读取 MIC 值，接着在 14 天进行最后读数(除非分离株在那段时间前变成耐药)以检测 RGM 分离株中功能性 *erm* 基因的存在与否[125]。这些基因的重要性尚未在临床试验中进行评估。但是，最近一项来自韩国具有里程碑意义的研究显示，在 64 例脓肿分枝杆菌脓肿亚种患者和 81 例脓肿分枝杆菌马赛亚种的肺部疾病患者中，大约 80%的脓肿分枝杆菌马赛亚种的患者采用包括大环内酯类在内的多药方案能够成功治疗，而对脓肿分枝杆菌脓肿亚种感染的患者仅有 20%的疗效[50]。研究者认为，克拉霉素联合其他抗生素治疗脓肿分枝杆菌肺部疾病的疗效降低，可以用克拉霉素的诱导性耐药来解释[50]。

根据最近的体外 *erm* 基因研究，在报告可能具有大环内酯类耐药性的分离株(如脓肿分枝杆菌脓肿亚种、猪分枝杆菌和脓肿分枝杆菌博氏亚种的大多数菌株)时，如果该分离株已经通过分子生物学技术(如基因测序技术)被鉴定为含有已知功能性 *erm* 基因的菌种或者亚种，则无须进行 14 天的培养。类似地，不含有功能性 *erm* 基因的菌种或亚种，包括塞内加尔分枝杆菌、外来分枝杆菌、龟分枝杆菌、免疫应答分枝杆菌、产黏液分枝杆菌群、脓肿分枝杆菌马赛亚种可能会被报告为对克拉霉素敏感[76-77,126-130]。但是该提案尚未得到 CLSI 的批准。

Choi 及其同事在 2012 年进行的一项研究也显示脓肿分枝杆菌脓肿亚种和脓肿分枝杆菌马赛亚种之间存在着其他药物敏感性的差异[131]。这些研究者观察到莫西沙星和 2 种大环内酯类药物(克拉霉素和阿奇霉素)对脓肿分枝杆菌和脓肿分枝杆菌马赛亚种的体外、离体和体内活性[131]。体外试验中，当莫西沙星联合一种大环内酯类对抗脓肿分枝杆菌时产生拮抗作用[定义为部分抑菌浓度(fractional inhibitory concentration，FIC)≥2]：与克拉霉素联合时为 65.4% (17/26)，而与阿奇霉素联合时为 46.2%(12/26)。在巨噬细胞培养和小鼠模型中也可看到类似结果。与之形成鲜明对比的是，相同的组合对脓肿分枝杆菌马赛亚种菌种则表现为无关(0.5<FIC<2)或协同效果(FIC≤0.5)。这些发现可能有助于进一步解释大环内酯类联合莫西沙星治疗方案对脓肿分枝杆菌和脓肿分枝杆菌马赛亚种疗效的差异[131]。有关抗菌药物敏感试验方法和患者治疗指南详见第 78 章。

十、结果的评价、解释和报告

RGM 分类的巨大变化很大程度上归功于过去 10～20 年间分子生物学检测技术的问世。已有多个新的菌种被人们所认识，一些以前的亚种

已经被列为种。在目前描述的约 89 种被证实的 RGM 菌种中，几乎 1/3 是过去 10 年内发现的。

推荐的菌种鉴定方法也在不断发展，包括 HPLC 和表型检测方法在内的关注和效率在逐渐下降，而分子生物学方法和 MALDI-TOF MS 技术则日益普及并且准确性越来越高。表型试验的作用有限，最好与分子生物学方法联合应用。目前，分子生物学方法和(或)蛋白质组学法是菌种鉴定的首选方法，并且通常也是鉴定新菌种或亚种的唯一方法，对于无法进行分子检测的实验室，应考虑将其 RGM 分离株转送到有分子生物学检测能力的参考实验室[75]。

RGM 的主要菌种(表 34-1)在不同的临床情况下有不同的药物敏感性和不同的毒力。疾病诊断方面应优先考虑血流感染(通常是导管脓毒症)、播散性或创伤后伤口感染和肺部疾病(尤其是合并支气管扩张者)。例如，产黏液分枝杆菌是一种公认的引起导管脓毒症的病原菌，但是由于该菌经常存在于自来水中，在痰标本中的该菌经常被认为是污染菌。最常在肺部标本中分离到并与疾病相关的 RGM 是脓肿分枝杆菌。但是，其他 RGM 如偶发分枝杆菌，除了在失弛缓症或类脂性肺炎病例标本外，很少被认为是致病菌，该细菌也可从呼吸道标本中分离出来。RGM 的致病潜力一般与临床表现[无法解释的发热、双相炎性病变(dimorphic inflammatory lesions)等]、患者的免疫状态、培养阳性的数目、从涂片阳性的标本中分离到的微生物的量以及菌种来源等因素有关[31]。一些已被确认的和新发现的菌种，已从环境标本中鉴定出来，但尚未确定为人类或动物的病原菌[71]。上述因素强调了对有临床意义的 RGM 分离株进行种水平的鉴定和药敏试验的必要性。此外，从单个样本中获得的分离株可能不如从多个样本分离的菌株临床意义大。

当对有临床意义的分离株进行菌株鉴定尚无结果时(即药敏试验可能先于菌种鉴定前完成)，应当按照 CLSI 的建议报告抗菌药物的 MIC。比如，在最终鉴定完成前，鉴定结果为“某种快速生长分枝杆菌”是可以接受的，但是报告应当包括警告语句“妥布霉素仅对龟分枝杆菌报告”[125]。

当报告 MIC 结果时，应当根据指南所推荐的折点对每种抗生素的 MIC 值进行解释(即敏感、中介或耐药)[125]。对于如替加环素这样没有推荐折点的药物，在其 MIC 值后应当标注“该菌种的 CLSI 折点尚未被确认”。此外，由于缺乏有文献记载的一线抗结核药物(即乙胺丁醇、利福平和异烟肼)的使用疗效，因此实验室不应当报告这些药物对 RGM 的 MIC[75]。

另外，若经过适当的抗菌药物治疗 6 个月后仍能培养出相同的菌种，则有必要采用分子生物学方法对菌种鉴定进行确认，并重新进行药敏试验[125]。

尽管近年来抗菌药物(包括新型大环内酯类、氟喹诺酮类、噁唑烷酮类和替加环素)已经增多了 RGM 所致疾病的治疗选择并改善其预后，仍迫切需要研发更加高效、安全的口服抗菌药物进行治疗。例如，就目前可用的抗菌药物而言，脓肿分枝杆菌脓肿亚种性肺病仍被认为是无法治愈的。RGM 的药敏试验是有必要做的，以便选择最佳抗菌治疗方案，并对随着 RGM 疾病长期治疗而可能发生的突变性耐药进行监测。

参考文献请扫二维码查阅

第5篇

革兰阴性菌

第35章　需氧革兰阴性菌的鉴定方法*

NIELS NØRSKOV-LAURITSEN，WINNIE RIDDERBERG

（单斌　译；张嵘、马筱玲　审校）

生物学正在发生一场革命，更准确地说，是一场生物学革命中的革命。当然，这指的是日益提高的核酸测序能力对已经被分子方法和概念彻底改变的学科所产生的影响。虽然其在遗传学、医学及生物技术应用领域中影响最为显著，但其最深远和持久的影响是人们对生物进化的理解及与其他生物学领域的关系。细胞从根本上来说是历史描述，通过读取信息（基因测序），彻底地改变了人们看待所有生物学的方式。在这场变革中，微生物学的改变在生物学领域中是最大的，因为在分子测序技术出现之前，细菌的进化还不可以通过实验来研究。

基于上述观点，Carl Richard Woese（1928—2012年）于1987年对细菌进化进行了综述[1]。继1962年Stanier和van Niel将组织细胞分为原核细胞和真核细胞之后，1977年Woese和Fox对细菌的rRNA序列进行了系统发育分析，揭示存在三个域，当时被命名为真细菌、古细菌和真核生物[或原始真核生物（urkaryotes）[2]，以真核细胞的细胞质成分为代表]。“终极分子计时器”（rRNAs）对细菌的分类产生了深远的影响。使用简易的形态学特征进行分类可能会导致不正确的细菌分类结果，如1923版的《伯杰细菌鉴定手册》（*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*）将红色的（沙雷菌属细菌）和黄色的（黄杆菌属细菌）划分为色杆菌科细菌。使用细菌生物学特征进行分类比较实用，这种过时的分类方法在以往伯杰细菌鉴定手册的多个版本中一直被使用，直到第2版《伯杰系统细菌学手册》（*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*）才引入了基于模式菌株、模式菌种或模式菌属的16S rDNA序列的分类学体系[3]。

从实践的角度看，临床微生物学的改变更加微妙。在日常工作中，无关紧要的分类（如“皮肤菌群”）和通俗的命名（如“球菌”）依然具有优势。从最初开始到1980年[4]，已有1792个经过证实的细菌种类名称，2017年5月25日这一数字上升到15 626个（http://www.bacterio.net/-number.html）。然而，最近发表的大多数细菌种类主要来源于环境或动物，而不是临床感染的标本，许多与人类有关的新菌种可能来源于国际研究，如人类微生物组项目（human microbiome project，HMP）。这些研究结果提供了细菌种类的更新及具有重要医学意义细菌生物学分类的改变[5-6]。更为重要的是，近年来具有实际意义的创新，包括通过PCR快速检测脑脊液中的重要病原体（第7章），以及用于研究细菌传播和评估感染控制的细菌分型方法（第11章）。然而，培养后细菌的鉴定还处于方法学转变的边缘，特别是在基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry，MALDI-TOF MS）的常规应用方面。

本章主要讲述革兰阴性杆菌的鉴定方法。培养细菌的表型特性对于初步鉴定具有重要意义，这些特性已被纳入需氧革兰阴性菌的定义中。然而，表型特征鉴定目前已达到顶峰，基于细菌DNA和蛋白质的鉴定方法正逐渐成为许多临床微生物实验室必不可少的技术手段。本章包含了

*本章包含Georges Wauters和Mario Vaneechoutte在本手册第11版第33章中呈现的部分内容

多种需氧革兰阴性杆菌快速而简便的鉴定方案和生化试验鉴定表，重点是在鉴定更困难的非发酵菌。此部分内容涉及本书第 11 版中的相关内容[7]。此外，我们还考虑通过 16S rRNA 基因测序、MALDI-TOF MS 和全基因组测序（whole-genome sequencing，WGS）进行鉴定。目前，上述技术的鉴定能力还没有达到经典表型特征鉴定的成熟水平，此方面临床医生将通过选择革兰阴性杆菌的分组来阐明其优势和不足；同样，非发酵菌是临床医生关注的重点。

需氧革兰阴性菌是针对其对空气中氧的耐受性来定义的，但存在对氧耐受的致病厌氧菌，这一现象在革兰阳性链球菌更加引人关注[8]。这一实用的定义来源于临床诊断或实验室工作，其定义不限定细菌新陈代谢的末端电子受体。同样，需氧革兰阴性菌广泛分布在系统进化树中。原核生物的命名规则由国际原核生物系统学委员会（the International Committee on Systematics of Prokaryotes，ICSP）制定。自 20 世纪 50 年代建立以来，细菌学分类规范也一直未涉及以上内容，ICSP 也未批准门或门的名称。然而，目前提议和有效公布的有 34 个门[9]。人类病原菌属 7 个不同的门，大多数临床相关革兰阴性菌属于变形菌门。非发酵的革兰阴性杆菌既属于拟杆菌门，也属于变形菌门，为其鉴定带来挑战。

非发酵菌常从临床标本中检测到。自从巴斯德表明细菌在无氧环境下，酸和醇是碳水化合物降解的主要终产物以来，发酵和无氧代谢就被视为同义词。根据目前的观念，当有机化合物作为最终的电子受体时，就会产生发酵代谢，而发酵必须在不含氧的检测条件下进行。一种未知革兰阴性菌是非发酵菌的最初线索包括细胞色素氧化酶阳性和在麦康凯琼脂上不生长，但最终通过接种倾斜的固体培养基确定了其氧化-发酵特性。

非发酵革兰阴性菌成为越来越多因疾病或药物治疗导致免疫受损患者感染的重要病原体[10]。它们在自然环境中广泛分布，并且具有多重、固有或获得性耐药的倾向。铜绿假单胞菌（第 44 章）和鲍曼不动杆菌（第 46 章）越来越多地获得对碳青霉烯类药物的耐药性，这使得临床对其感染的治疗非常困难[11]。此类细菌获得位于可转移质粒上的碳青霉烯酶基因，总体上增加了碳青霉烯酶扩散的风险。

一、表型试验方法和鉴定

（一）术语

在介绍细菌鉴定的方案和方法之前，先对一些术语进行说明。仅使用底物名称来命名一种生化试验是不够的。为避免混淆，建议根据其特定的代谢产物（如“吲哚试验”）或酶活性的检测（如“氧化酶”“吡咯烷酮氨肽酶”）来命名；酶活性是指把细菌悬浮液与底物混合孵育无须细菌生长即可显示其酶活性。细菌利用 3 种主要的代谢途径分解葡萄糖。因为“糖酵解”（glycolysis）可以表示发酵和有氧氧化之前的生化代谢循环，所以用“碳水化合物产酸”（acidification of carbohydrates）和“糖分解”（saccharolysis）来描述能分解糖的非发酵菌更合适。类似地，“氧化”是一个俗称，通常用来表示能分解糖的非发酵菌，以区别于不酵解糖（asaccharolytic）的非发酵菌。在严格的生物化学术语中，“氧化”指的是氧化磷酸化，即电子从电子供体转移到非有机电子受体（如氧气），发酵则相反。“糖分解的非发酵菌”一词比“氧化”更为合适。

“产酸”是指发酵菌和非发酵菌分解碳水化合物产酸。除产酸能力较强的铜绿假单胞菌和不动杆菌属的某些菌种外，非发酵菌的产酸能力通常比发酵菌弱得多。通过大量接种、提供良好的通气和使用适当的 pH 指示剂可以实现对细菌弱产酸的检测。此外，限制蛋白胨的用量也是非常重要的，因为蛋白质需氧降解的碱性产物会中和酸性产物。最初 Hugh 和 Leifson 于 1953 年报道的含 0.2%蛋白胨和 1%碳水化合物的氧化/发酵培养基[12]已广泛应用于检测弱产酸，而使用斜面固体培养基检测非发酵菌对碳水化合物的产酸能力效果会更好。第 20 章讲述的克氏双糖铁琼脂（Kligler's iron agar，KIA），三糖琼脂（triple sugar agar）也都含有蔗糖。临床相关的非发酵菌，仅希瓦菌属菌的一些菌种产硫化氢（H_2S）。

如果需要通过更多的表型特性和生化试验来对需氧革兰阴性非发酵菌进行鉴定，可参阅本手册第 11 版[6]。

（二）表型和生化试验鉴定流程

革兰阴性菌可通过下述的表型试验进行初步鉴定。应该注意的是，不动杆菌属的某些菌种革

兰染色结果不定。此外，有些细菌，如阴道加德纳菌(*Gardnerella vaginalis*)(第 29 章)和少数乳杆菌属细菌(第 54 章)从遗传基因分类属革兰阳性菌，但在常规染色中可被染成革兰阴性。

(三)SBA 培养基上生长不良或不生长的革兰阴性菌

图 35-1 和图 35-2 显示对营养物质要求高，在羊血琼脂(sheep blood agar，SBA)上生长不良或完全不生长的革兰阴性菌的表型特征鉴定流程及生化试验鉴定方法。不动杆菌属细菌和大多莫拉菌属细菌在 SBA 培养基上生长不良，但在 48 h 内可清晰地观察到菌落。其最初鉴别可依靠显微镜观察。淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*)和脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)的选择性琼脂通常含有多黏菌素 B、林可霉素和两性霉素 B，主要用于抑制多种细菌和真菌，以及含有用于抑制变形杆菌蔓延生长的甲氧苄啶。然而，淋病奈瑟菌，尤其是来自血流感染的脑膜炎奈瑟菌，需在营养丰富、不含抗菌药物的培养基上进行培养(第 36 章)。卡他莫拉菌(*Moraxella catarrhalis*)常分离自眼、耳和鼻咽拭子标本，尤其是儿童患者标本。该菌为灰白色的小菌落，在接种环的推动下菌落可在琼脂表面滑动；三丁酰甘油的水解能力可将卡他莫拉菌与奈瑟菌区别开[13]。布鲁菌病(*Brucellosis*)仍然是一个世界性的问题，在发展中国家尤为突出。它可累及人体所有器官。处理疑似布鲁菌病患者的样品必须格外小心，因为处理样品的工作人员面临相当大的感染风险(第 49 章)。血培养阳性革兰阴性小杆菌的直接脲酶试验，可比常规实验室方法提前 2～3 天初步诊断布鲁菌病[14]。氧化酶阳性的球杆菌可能是鲍特菌属(*Bordetella*)。由于培养困难，百日咳鲍特菌(*Bordetella pertussis*)和副百日咳鲍特菌(*Bordetella parapertussis*)常使用核酸检测

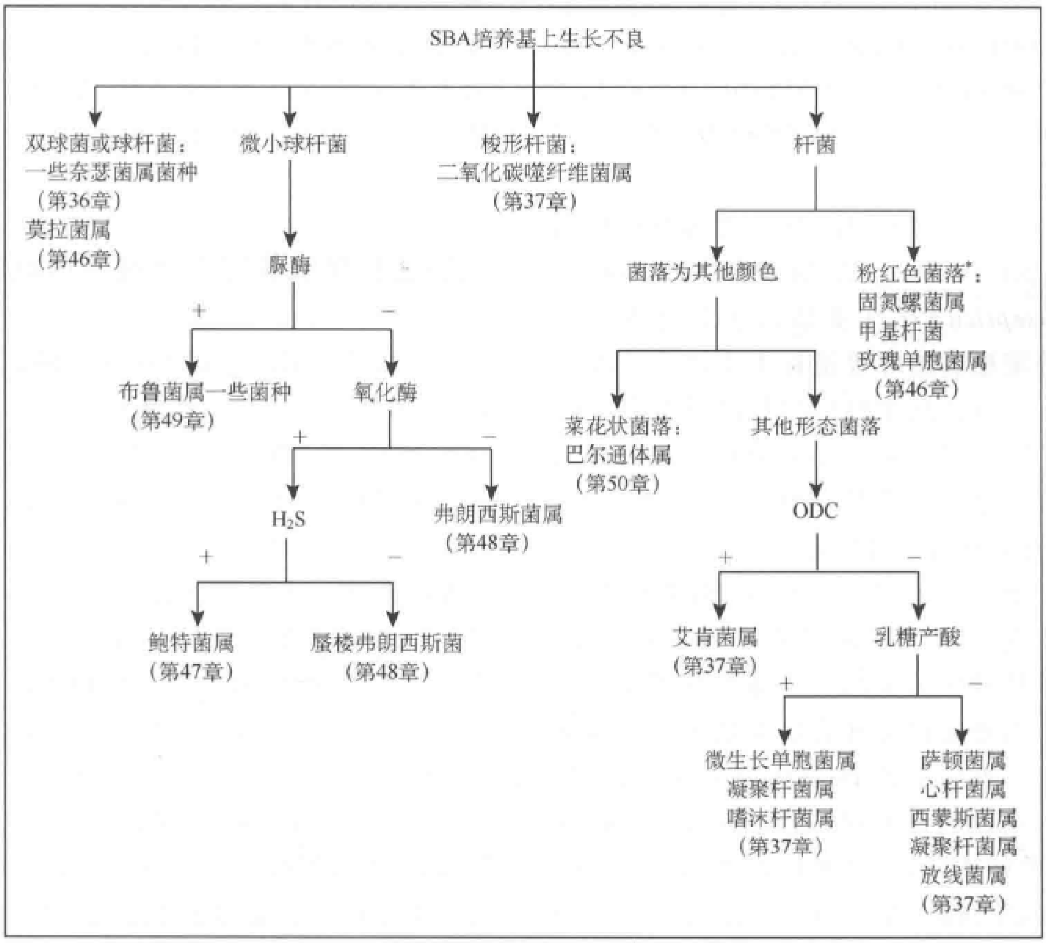


图 35-1　SBA 培养基上生长不良的革兰阴性杆菌和球杆菌的初步鉴定流程

注：ODC. 鸟氨酸脱羧酶；* 紫色菌落可能是色杆菌属某些菌种(第 37 章)；粉红色菌落，发酵提示可能是沙雷菌属某些菌种(第 40 章)；粉红色菌落非发酵革兰阴性杆菌可通过 β-半乳糖苷酶、胰蛋白酶、脲酶、吡咯烷酮氨肽酶和氧化酶试验进行鉴别(第 46 章)

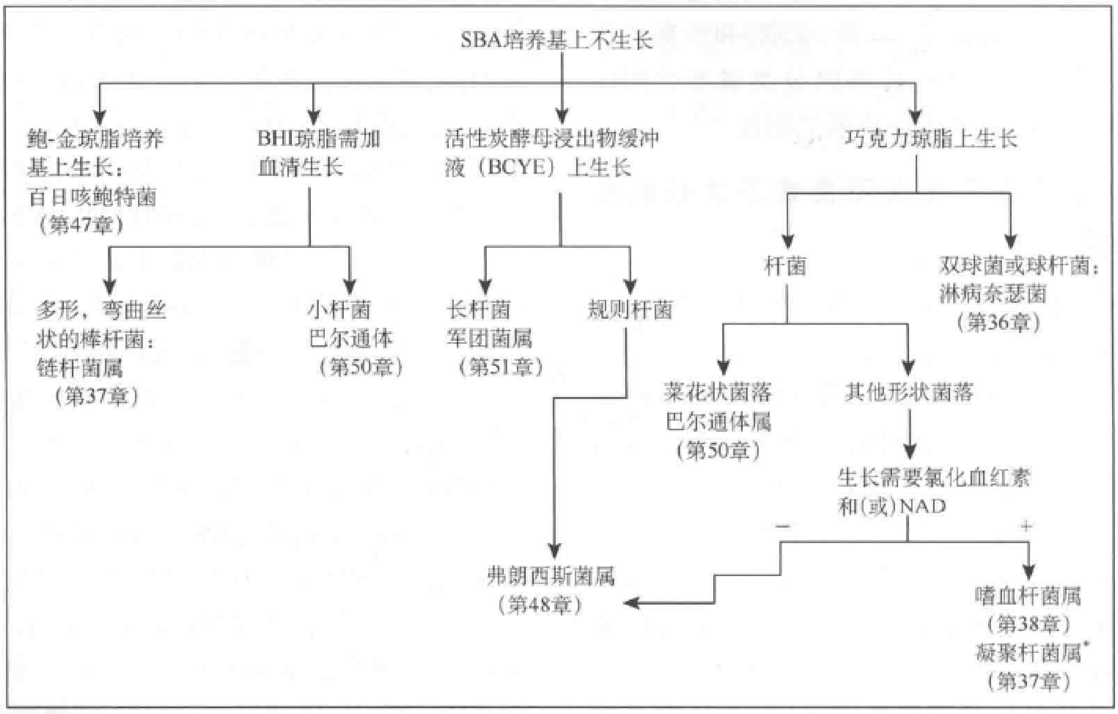


图 35-2 SBA 培养基上不生长的苛养革兰阴性杆菌和球杆菌的初步鉴定流程

注：BHI. 脑心浸出液；NAD. nicotinamide adenine dinucleotide，烟酰胺腺嘌呤二核苷酸；* 仅惰性凝聚杆菌生长总是需要 NAD；*nadV* 基因的突变导致放线杆菌属某些菌株、凝聚杆菌属、鸡禽杆菌属（*Avibacterium*）和巴斯德菌属某些菌种生长需要 NAD

或对百日咳患者进行血清学试验，彼得里鲍特菌（*Bordetella petrii*）和支气管脓毒鲍特菌（*Bordetella bronchiseptica*）在许多培养基上均生长良好，其可在特定患者的呼吸道标本中培养分离出来（第 47 章）。氧化酶阳性且生长缓慢的革兰阴性菌啮蚀艾肯菌（*Eikenella corrodens*）为艾肯菌属的唯一种，可侵蚀培养基琼脂表面（译者注：呈凹陷生长），并具有特殊的菌落形态。

对于在 SBA 培养基上不生长、苛养的革兰阴性菌，特别是巴尔通体菌属的某些细菌、百日咳鲍特菌、弗朗西斯菌属的一些细菌及军团菌属的一些细菌，需要使用额外的培养基进行初步鉴定（图 35-2）。土拉弗朗西斯菌属（*Francisella tularensis*）仅在北半球发现。必须谨慎处理疑似土拉热患者的样本，因为处理培养物的工作人员有相当大的感染风险（第 48 章）。流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）常在来自黏膜表面和呼吸道的临床标本中检测到，而其他嗜血杆菌属的一些细菌和凝聚杆菌属的一些细菌则很少被认为是引起感染的病原体（分别见第 38 章和第 37 章）。

（四）兼性厌氧的革兰阴性菌（葡萄糖发酵）

肠杆菌科细菌是临床标本中最常见的革兰阴性菌（第 39～43 章）。简便的鉴定方法是使用选择性培养基，如专门的科玛嘉显色培养基（CHROMagar，Becton Dickinson），随后使用自动化鉴定仪进一步鉴定（第 5 章）。也可通过经典的表型技术进一步鉴定到种。将在 SBA 上生长快速的菌株接种到 KIA 管中，如果 KIA 整管培养基都没有变黄，则该菌株对乳糖和葡萄糖发酵均为阴性，即为非发酵菌。如果第 2 天试管的底端和斜面都为黄色，则该菌株对乳糖和葡萄糖的发酵都是阳性。如果只有底部是黄色的，则乳糖发酵阴性，葡萄糖发酵阳性。高盐耐受（在高浓度盐培养基下生长），触酶和氧化酶均阳性（梅氏弧菌除外），可能为弧菌属的某些细菌（第 43 章）、氧化酶阳性、高盐耐受阴性表明可能是邻单胞菌属的某些细菌（第 40 章）或气单胞菌属的某些细菌（第 42 章）。发酵乳糖、海藻糖或木糖是肠杆菌科（第 39 章和第 40 章）和耶尔森菌属（第 41 章）多个菌种

的特性；而哈夫尼亚菌科和摩根菌科的一些菌种不发酵这 3 种糖（第 40 章；有关肠杆菌目 7 个科的生物学特性参见参考文献[15]）。

巴斯德菌属的一些细菌通常可在动物咬伤患者的标本中检测到，其可能是这些标本中的优势菌（第 37 章）。在动物咬伤的患者样本培养中，快速生长且未达到肠杆菌科菌落大小的灰白色菌落，有时氧化酶阳性，特别是在麦康凯琼脂上不生长，提示可能是巴斯德菌。贝蒂巴斯德菌（*Pasteurella bettyae*）是一种罕见的引起人泌尿系统感染的病原菌。

（五）革兰阴性非发酵菌（专性需氧菌）

非发酵菌通常为严格的需氧菌，尽管一些非发酵菌，如所有的反硝化菌（利用亚硝酸盐产生氮气）可在氧化代谢中利用硝酸盐和（或）亚硝酸盐作为替代电子受体厌氧生长。基于氧化酶和绿脓素（pyoverdin），加上 4 项生化试验（产硫化氢、吲哚试验、胰蛋白酶（trypsin）和吡咯烷酮氨肽酶（pyrrolidonyl aminopeptidase，PAP），本手册第 11 版提供的需氧非发酵菌双歧鉴定流程图，对 8 组革兰阴性非发酵菌进行了鉴别（表 35-1）。产绿脓素是假单胞菌属一些菌种的重要特征；黄绿色、水溶性荧光色素是一种强大的三价铁（Fe^{3+}）的清除剂和转运体。作为一种荧光色素，它是细菌鉴定的现成标记物，作为一种铁载体，它在满足细菌对铁的绝对需求方面起着重要的生理作用[16]。荧光绿脓素是细菌在 Mueller-Hinton 琼脂上产生的绿色色素。金氏 A 和 B 培养基（King's medium A and B）的使用参见第 44 章所述。可以将细菌鉴定到种的附加试验还有脲酶、硝酸还原酶、亚硝酸盐还原酶、赖氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、苯丙氨酸脱氨酶、吐温 80 酯酶和三丁酰甘油酯酶试验，葡萄糖、甘露醇、木糖和乙二醇产酸试验，明胶、七叶苷和淀粉水解试验；去铁胺和黏菌素的敏感性试验，动力、细菌形态、菌落颜色、色素和形态学，41℃生长试验，以及一些其他特性。检测试剂可每年制备 1 次，4℃保存。根据这些表型特征试验，可鉴定 2 个门（拟杆菌门和变形菌门），5 个纲，10 个目，16 个科和 37 个属的 90 种革兰阴性非发酵菌。上述细菌的实验室检测可以查阅本书第 11 版[7]及相关章节（第 44～47 章）。

表 35-1　需氧生长革兰阴性非发酵菌的主要表型特征（专性需氧菌）

群特性		细菌	章
A.	产硫化氢（＋）	希瓦菌属一些细菌	46
B.	产硫化氢（－），产绿脓素（＋）	假单胞菌属一些细菌	44
C.[a]	产硫化氢（－），产绿脓素（－），吲哚试验（＋）	金黄杆菌属一些细菌；伊丽莎白菌属一些细菌	46
D.[b]	产硫化氢（－），产绿脓素（－），吲哚试验（－），氧化酶（－）	鲍特菌属一些细菌；不动杆菌属一些细菌；氧化酶（－），伯克霍尔德菌属一些细菌和假单胞菌属一些细菌	44～47
E.	产硫化氢（－），产绿脓素（－），吲哚试验（－），氧化酶（＋）		
	E(i).[c] 胰蛋白酶（＋），吡咯烷酮氨肽酶（＋）	鞘氨醇杆菌属一些细菌；类香味菌属一些细菌；苍白杆菌属一些细菌	44～46
	E(ii).[d] 胰蛋白酶（＋），吡咯烷酮氨肽酶（－）	短波单胞菌属一些细菌；绿脓素阴性的铜绿假单胞菌，荧光假单胞菌和恶臭假单胞菌	44～47
	E(iii).[e] 胰蛋白酶（－），吡咯烷酮氨肽酶（＋）	食酸菌属一些细菌；无色杆菌属一些细菌；丛毛单胞菌属一些细菌；贪铜菌属一些细菌；罗尔斯顿菌属一些细菌	45～47
	E(iv).[f] 胰蛋白酶（－），吡咯烷酮芳胺酶（－）	伯克霍尔德菌属一些细菌；丛毛单胞菌属一些细菌；血液杆菌属一些细菌；莫拉菌属一些细菌；寡源菌一些细菌；冷杆菌属一些细菌	45～46

注：[a] C 群包括阿尔卑斯浴者菌、动物溃疡伯杰菌、有毒威克斯菌、法氏沃氏菌、水谷鞘氨醇杆菌和短稳杆菌。[b] D 群包括嗜麦芽窄食单胞菌和腿伤克斯特菌。鲍特菌属细菌包括亚洲监网鲍特菌，霍姆鲍特菌和副百日咳鲍特菌。[c] E 群(i)包括不解糖假苍白杆菌、黏泥异地菌、芦苇潘诺尼亚杆菌、放射根瘤菌及吡咯烷酮氨肽酶阳性的缺陷短波单胞菌(20%)。[d] E 群(ii)包括产碱假单胞菌、门多萨假单胞菌、假产碱假单胞菌、施氏假单胞菌及胰蛋白酶阳性的粪产碱杆菌(30%)。[e] E 群(iii)包括欣氏鲍特菌、彼得里鲍特菌及食酸德尔夫特菌。丛毛单胞菌属细菌包括土生丛毛单胞菌和睾酮丛毛单胞菌。[f] E 群(iv)包括支气管脓毒鲍特菌、耶氏副球菌、解几丁质食肉蝇单胞菌和胰蛋白酶阳性的粪产碱杆菌(70%)及吡咯烷酮氨肽酶阴性的吉拉德贪铜菌(85%)。丛毛单胞菌属细菌包括水生丛毛单胞菌和克斯特丛毛单胞菌

二、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

由于MALDI-TOF MS的简便和稳定，MALDI-TOF MS的应用改变了常规临床微生物实验室的鉴定方法（第5章）。设备初期投入成本高，但用于测试分析的试剂耗材成本低，且鉴定速度极快。MALDI Biotyper（Bruker）和Vitek MS（bioMérieux）都有仅供研究使用及体外诊断的强大数据库[17-18]，但其鉴定算法并不相同。Vitek MS是由多个参考质谱及特定菌种而其他亲缘关系相近菌种并不存在的特征峰构建的“超级质谱数据库”。相反，MALDI Biotyper数据库来自大量特定和参考菌株的MSPs（mass spectrometry projections）数据库（译者注：数据库内的数据，实际上就是通过参考菌株等建立的蛋白指纹图谱数据库）。

对于在常规临床微生物实验室中遇到的绝大多数菌种，MALDI-TOF MS数据库几乎都能覆盖。与人体感染相关的菌种鉴定已经达到很高的水平，但还远远不够。例如，临床分离保存的、最初被鉴定为脑膜脓毒伊丽莎白金菌（*Elizabethkingia meningoseptica*），可能是后来命名为伊丽莎白金菌属（*Elizabethkingia*）的一个种[19]，且在醋酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合群中最近也命名了新的菌种[20]。数据库的不断完善可以区分亲缘关系相近的菌种，如将“非溶血的溶血嗜血杆菌”从流感嗜血杆菌中鉴别分离出来[21]，这些鉴别几乎不可能通过表型特征手段来实现。有文献报道了一种使用MALDI-TOF进行布鲁菌鉴定的简单且安全的方法[22]。

如上所述，90种需氧革兰阴性菌可以通过一系列的补充试验鉴定到种[7]。目前，并非所有这些菌种都包含在MALDI-TOF MS数据库中。VITEK MS V3.0数据库包括约2/3的上述菌种，某些临床不常见的菌属如食酸菌属（*Acidovorax*）、血液杆菌属（*Haematobacter*）和冷杆菌属（*Psychrobacter*）也不包括在上述数据库中。另一方面，数据库中现已包含大量伯克霍尔德菌菌种数据；V3.0数据库包含洋葱伯克霍尔德菌复合群中已有效命名的21种中的16种，而在本手册第11版讲述的表型特征流程中只包括洋葱伯克霍尔德菌复合群的2个种。

2016年版的Bruker系统MSP库包含6903个MSPs，其中包括洋葱伯克霍尔德菌复合群9个菌种的32个MSPs。假单胞菌属为临床重点关注领域，数据库有80个菌种的171个MSPs，其中包括铜绿假单胞菌群12个菌种的25个MSPs及恶臭假单胞菌群6个菌种的48个MSPs（第44章）。Bruker数据库包含大量MSPs数据，表明其对菌种的鉴定具有巨大潜力，但这必须在以常规临床标本及具有挑战性的参考菌株为重点的多中心研究中得到解决。在一项MALDI Biotyper细菌鉴定能力的多中心评估中，临床分离的2265株需氧革兰阴性菌中有2174株以高可信度鉴定到种的水平（分值≥2.00）[23]。

使用Biotyper软件可以计算并显示距离矩阵和树状图，这在遇到难以鉴定的菌株或推测新菌种时可能是有帮助的。参考MSPs的鉴定是依据细菌系统发育谱系建立的Bruker数据库，可以从NCBI浏览器分类中获取单个菌种的信息。质谱比对中受生物学信息限制，意味着对距离超过500的菌株进行聚类分析无法提供足够信息量[24]。

三、核糖体RNA基因序列应用于细菌鉴定

1980年发布的细菌名称批准清单保留了将近1 800个菌种[4]。2002年，专门的委员会重新评估了细菌学中菌种的定义，并建议对新菌种的特性描述应包括几乎全长的16S rRNA基因序列，并使用其他分子技术的结果来描述其DNA的关联性[25]。

（一）细菌鉴定和系统发育推断

随着测序技术的引入，在核苷酸水平上比较细菌基因组成为可能。然而，为克服全基因组比对的挑战，并确保临床实验室的实际应用，有必要确定可靠的代表菌种标志的基因。

蛋白编码基因在氨基酸水平上是保守的，进化相对较快。但核苷酸水平上的巨大差异意味着能通过这些基因进行亲缘关系相近菌株的分类。几种蛋白编码基因已展示出作为系统发育标志物的巨大潜力，包括*rpoB*、*gyrB*、*recA*、*recN*和*cpn60*[26-29]。然而，这些基因各自的巨大差异也是

设计 PCR 通用引物的障碍。小亚基(SSU)rRNA(或 16S rRNA)一直被选择作为细菌系统发育的标志物[1]。16S rRNA 基因存在于所有原核细胞中,很少受到基因水平转移的影响。该基因相对较大(约 1500 bp),包含保守区和可变区。可变区与保守区的进化速度不同,从而可以区分不同的细菌。可变区的侧翼序列非常保守,有利于通用引物的设计。基于这些特性,可以使用 16S rRNA 基因序列进行细菌系统发育分析和鉴定[30-32]。

(二)基于 16S rRNA 基因的鉴定

编码 16S rRNA 的基因由被保守区包围的 9 个可变区组成。可变区域内的变异程度不尽相同,且存在具有更多突变的突变热点。这些区域因细菌种类不同而不同,不同的区域为不同的细菌群提供了更高的系统发育分辨率[30]。在很多应用中,16S rRNA 全基因测序受成本或测序技术的限制,通常只分析部分序列。由于 16S rRNA 基因区域内核苷酸位置的变化,谨慎选择最佳的 16S rRNA 基因区域对于研究细菌的系统发育或正确识别至关重要。虽然 V4 区域或 V4～V6 片段适用于大多数常规用途,但对大多数细菌较短基因片段的分析不能有效进行属以下进一步区分鉴定[33-35]。

16S rRNA 基因区域的选择也取决于现有的测序技术。传统的 Sanger 测序可读取超过 500 个以上碱基,但通量低。下一代测序技术具有更高通量,但代价是读长更短。目前,短读测序技术已广泛用于与 16S rRNA 基因数据库进行比对,尤其是用于微生物群的研究。然而,对于细菌种水平的鉴定,需要 16S rRNA 基因全序列。相对于读取全序列的传统测序技术,最新的替代技术包括单分子实时测序(single molecule real time sequencing, SMRT)[36]和纳米孔(nanopore)测序[37]。随着错误率的降低,未来使用长读技术进行细菌鉴定、系统发育,以及菌群分析前景十分广阔。

设计能广泛应用于多数细菌的 16S rRNA 基因 PCR 扩增引物,具有极大挑战。因为即使是保守区域也会发生一定程度的变异,只有非常小的 16S rRNA 基因片段是真正保守的。通用引物在生物分类学上的差异很大,应仔细选择引物,以免产生偏差。不合适的引物可能导致对某些种甚至细菌分群的鉴定错误[33,38]。简并引物可提高覆盖率,但选择侧重于特定位置的引物更具有鉴别性。可以使用 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)在线分析工具针对常用的核糖体数据库进行全方位搜索,以获得理论覆盖范围,从而为特定应用选择最佳引物[33]。

(三)16S rRNA 基因库

大多数公开可用的数据库包含全长或接近全长的基因序列,以及较短的基因片段序列,序列文件补充有描述分类位置的元数据[译者注:元数据(metadata),又称中介数据,文件系统中的数据分为数据和元数据,数据是指普通文件中的实际数据,而元数据是为描述数据的数据,主要是描述数据属性信息,用来支持如存储位置、访问权限、资源查找及文件数据块的分布信息,是为描述数据的内容或特色,进而达到协助数据检索和管理的目的]。最常用的公共数据库包括 SILVA[39]、Greengenes[40] 和 the Ribosomal Database Project[41]。数据库有专人维护,并包含高质量的基因序列数据。2013 年 5 月公布的 Greengenes 包含来自细菌和古菌的 202 421 个 16S rRNA 基因序列(http://greengenes. secondgenome. com/)。核糖体数据库项目于 2016 年 9 月公布数据库的更新版,其中包含 3 356 809 个细菌和古菌的 16S rRNA 基因序列(http://rdp. cme. msu. edu/index. jsp),以及 SILVA 的 132 个数据库共 6 073 181 个源自细菌和古菌的 16S rRNA 基因序列[SSU Parc)(www. arb-silva. de)。SILVA 还提供了一个数据库,该数据库仅包含长度超过 1200 个碱基的序列(SSU:核糖体小亚基(ribosomal small subunit);2 090 668 个条目],以及一个参考数据库,其中已过滤掉所有高度相同的序列(SSU 参考 NR99;695 171 个条目)。这些数据库的主要局限性在于所收录的序列会因选择 16S rRNA 引物而产生偏差。因此,数据库很可能没有涵盖全部的生物多样性。最近的研究表明,将多聚腺苷酸尾[译者注:poly(A) tailing 即多聚腺苷酸尾,是位于 mRNA 上的 150～200 个腺苷酸残基,又称为特殊的尾巴结构,一些原核生物的 mRNA 都会被多聚腺苷酸化,但多聚腺苷酸尾的功能与真核生物有所不同]及 SSU rRNA 基因的反转录与合成的长读序列相结合,可以在不使用引物的情况下获得全长小亚基 rRNA 序列,且这

种方法可很大程度地揭示复杂微生物环境中变异多样性[42]。不使用引物及16S rRNA的全基因序列可以显著扩大SSU序列库的容量，从而增加正确鉴定细菌的可能性。

(四)局限性

16S rRNA基因序列鉴定存在一定的局限性。16S rRNA基因的基因组内多样性一般低于1%，因为同源重组有效地维持了这些基因在细胞内的同质性。但是，对于某些菌种，16S rRNA基因拷贝的基因组内异质性明显大于定义菌种的阈值，从而影响其鉴定结果[43]。

长期以来，DNA-DNA杂交一直是分类学上的金标准，低于70%的DNA-DNA关联性可以用来区分不同的菌种[44]。一般认为，16S rRNA基因序列的相似度低于97%的序列来自不同菌种，但对于相似度评分97%以上的解释仍不明确；多个细菌复合群中，不同的菌种具有几乎相同的16S rRNA基因序列，但其DNA-DNA关联性明显低于70%的菌种鉴定阈值[31,45-46]。有研究者建议，对不同菌种的鉴定使用不同的阈值[31,47]。

无色杆菌属细菌的16S rDNA序列表现出高度相似。图35-3显示使用近全长16S rRNA基因序列、5个多位点基因序列分析和*nrdA*基因分析对34个临床菌株与7种模式菌株进行比较。16S rRNA基因测序无法区分无色杆菌属细菌的一些菌种，而标志基因*nrdA*几乎与5个基因位点MLSA一样有效；菌株A30被*nrdA*序列错误分类，类似地，鲁兰无色杆菌(Achromobacter ruhlandii)簇的自展值支持度也很低(译者注：系统发育树最常用到的3个指标分别是距离标尺、分支长度和自展值，其中自展值显示细菌之间的相似度，低自展值一般靠近分支末端，如果低自展值靠近根，则可能表明相似度太低)。

(五)在细菌种级水平提高细菌分类的准确率

由于某些菌属中16S rRNA基因内部的基因序列高度相似，故细菌种水平的鉴定并不总是可行。将分析区域扩大到整个16S～23SrRNA区

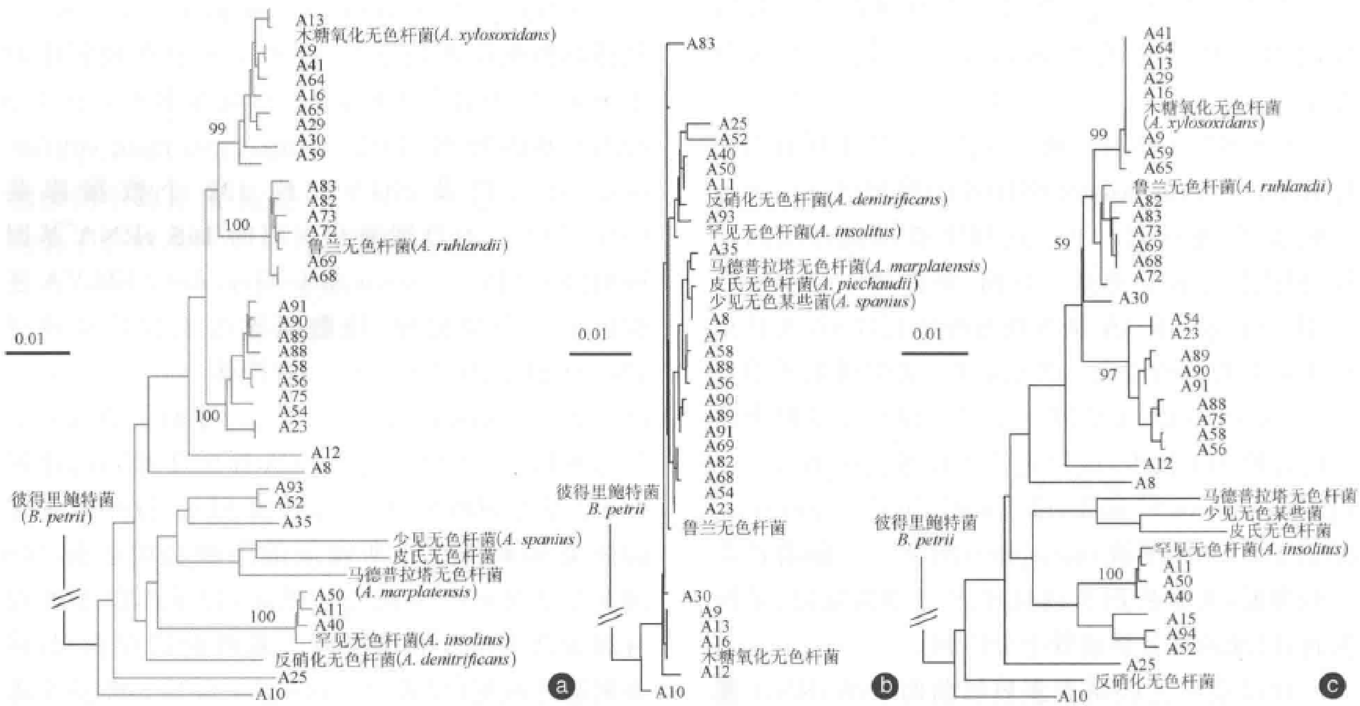


图35-3 以彼得里鲍特菌模式菌为外群，34株临床无色杆菌和7株无色杆菌模式菌的邻接树图(Neighbor-joining dendrograms)
注：a. 5基因MLSA(2098个核苷酸)；b. 近全长16S rRNA基因序列(1309个核苷酸)；c. *nrdA*基因片段(765个核苷酸)。MLSA和16S rRNA基因序列来自文献[60]，*nrdA*测序如前所述[29]。主簇结点左侧的数字为重复1000次计算出的自展支持率；a和c中没有模式菌株的大簇随后被有效地命名为罕见无色杆菌。短横棒表示每100个残基中有1个被替代

域，明显提高了亲缘关系较近细菌的分类学上的鉴别率。PCR扩增约4500bp的rRNA操纵子片段，然后对扩增产物进行二代测序，可将菌种鉴定的准确性由16S rRNA基因Sanger测序的56%提高到使用整个16S～23S rRNA的93%[48]。

随着第3代长读测序技术的发展，在单个读长中获得全长16S-23S rRNA基因区域序列成为可能。尽管有较高的错误率，但与传统的16S rRNA基因分析相比，当使用16S～23S rRNA测序时可以提高其分辨率[49]。

采用16S～23S rRNA测序进行细菌鉴定和菌群分析的主要局限性在于，目前缺乏包含16S rRNA和23S rRNA基因序列的参考数据库。数据库中积累的高质量参考数据量对于将细菌精确鉴定到种的水平至关重要。

四、全基因组测序

下一代基因测序作为临床微生物学中强大工具的作用日益得到证明(第17章)。当需要使用一种具有最高鉴别能力的方法对病原菌进行分型时，如在医院内感染暴发期间(第11章)，全基因组测序(whole-genome sequencing，WGS)可用于常规实验室工作。目前，WGS的使用最适合于分批分析样本[50]。虽然这种方法适用于科研或监测，但对于常规鉴定并不十分理想。用于DNA和RNA测序的便携式实时设备，如来自牛津纳米孔技术公司(Oxford Nanopore Technologies)的MinION，可能会对实验室工作流程产生深远影响。

(一)鉴定和分型

由于普遍存在大量高质量的参考数据，16S rRNA基因序列非常适合将菌株初步鉴定到属，如果利用WGS进行菌株鉴定，越来越多的网站提供了有关鉴定、分型、耐药性和毒力基因搜索的功能。截至2017年12月，超过17 000个有代表性的细菌基因组可在NCBI上获得，也可以将FASTA格式核苷酸序列提交BLAST进行检索；但应该强调的是，许多代表性细菌基因组尚未给出菌种名称，给出的菌种名称也并不一定就代表是合法命名的菌种名称。对模式菌株的基因组序列进行综合整理，有利于使用WGS进行菌株鉴定。

多位点序列分型(multilocus sequence typing，MLST)通常基于7个管家基因，已成为初步通过表征判断是否感染暴发有价值的工具(第11章)。下一代测序成本的大幅降低使WGS的价格比传统的MLST PCR和Sanger测序更实惠。DNA序列可以提交到基因组流行病学中心(Center for Genomic Epidemiology，CGE)(http://www.genomicepidemiologyy.org/)和其他网站进行查询，这些网站可以从100多个细菌MLST数据库中提取序列进行比对。传统的MLST方案提供了一种适合于菌群多样性研究的序列类型，但是基于非常有限的一部分细菌基因组进行分型可能会出现错误[51]。最近，基于WGS的分型被证明非常有效。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism，SNP)是基于将原始序列读取结果映射到一个参考基因组，以对比基因和基因间区域的差异，参考基因组的选择是SNP分析的基础。逐一基因的分析方法是基于对分类数据的推断，该分类数据来自核心基因组一组预定义基因的等位基因变异(核心基因组MLST)或来自核心基因组和辅助基因组(全基因组MLST)。核心基因组由该菌种的所有或几乎所有基因组中存在的所有基因组成，而泛基因组由该菌种的任何菌株中存在的基因组成。另一种方法是根据预测蛋白质的存在与否对分类数据进行推断(多位点预测蛋白质序列分型)，这点可以通过核心基因组或全基因组测序来完成[52]。基于WGS的分型方案是极具吸引力的分子和生物信息学手段，未来可能成为临床微生物学的分型方法。

(二)新的、鉴别力高的PCRs技术进展

由于存在发生洋葱综合征(一种致命性坏死性肺炎合并菌血症)的风险，洋葱伯克霍尔德菌复合群及其相关病原菌已成为引起囊性纤维化(cystic fibrosis，CF)的重要病原体，该细菌对抗生素天然多重耐药，菌株可在患者之间传播。伯克霍尔德菌属包括50多种正式发表的菌种，可分为4组(第45章)。定植于囊性纤维化患者呼吸道的菌株主要是洋葱伯克霍尔德菌复合群，该复合群有21个正式命名的菌种[53]。以往，洋葱伯克霍尔德菌是囊性纤维化的主要病原体[54]，但针对洋葱伯克霍尔德菌隔离措施的实施，导致病原体逐渐转变为多噬伯克霍尔德菌(*Burkholderia multivorans*)[55]；虽然在土壤和水样本大规模培养中

未能分离出该菌，多噬伯克霍尔德菌成为囊性纤维化患者感染的优势菌，很有可能是从环境中偶然获得[56]。考虑到囊性纤维化患者中存在洋葱伯克霍尔德菌流行株的传播，需要对特定的临床环境进行快速的检测和鉴定。

目标微生物的完整蛋白质编码基因可以在NCBI的GenBank中下载，也可以对本地生成的WGS数据进行分析。泛基因组学分析管道使用标准台式计算机对成千上万个样本的数据进行分析，从计算角度考虑不影响分析结果质量是不可能的。细菌WGS正逐渐成为常规，测序之后的序列组装问题也得到了很好的解决。最后一步即相关基因的注释比较困难，Prokka[57]（译者注：快速原核基因组注释描述信息软件，rapid prokaryotic genome annotation）是一个命令型软件工具，它可产生标准兼容的输出文件，以进行后续分析或者在基因组浏览器中查看。Prokka是基于Perl语言开发的，该软件基于蛋白质编码基因数据（蛋白质序列、核酸序列及注释描述信息）对多株细菌进行泛基因组自动化分析，主要分析功能包括功能基因的聚类、泛基因组特征分析、功能基因的遗传变异分析、菌种进化分析、基因簇的功能富集分析；用户可以通过一条命令完成这些分析工作，在一台普通台式机上充分注释一个细菌基因组草图的时间不到10min。推荐用Prokka创建基因组注释文件导入Roary[译者注：Roary(rapid large-scale prokaryote pan genome analysis)，原核泛基因组分析管道软件]软件进行分析，Roary是一款快速的大型原核生物泛基因组分析工具软件[58]。该方法被用来分析来自16个洋葱伯克霍尔德菌复合群的24个基因组序列。共发现60 391个基因簇，仅有778个“核心基因”存在于所有菌株中。然而，编码262个已知蛋白质和189个假定蛋白质的451个基因仅在5株洋葱伯克霍尔德菌中存在。图35-4为显示核心基因组和辅助基因组存在和缺失的系统发育树与矩阵的对比。该分析为一

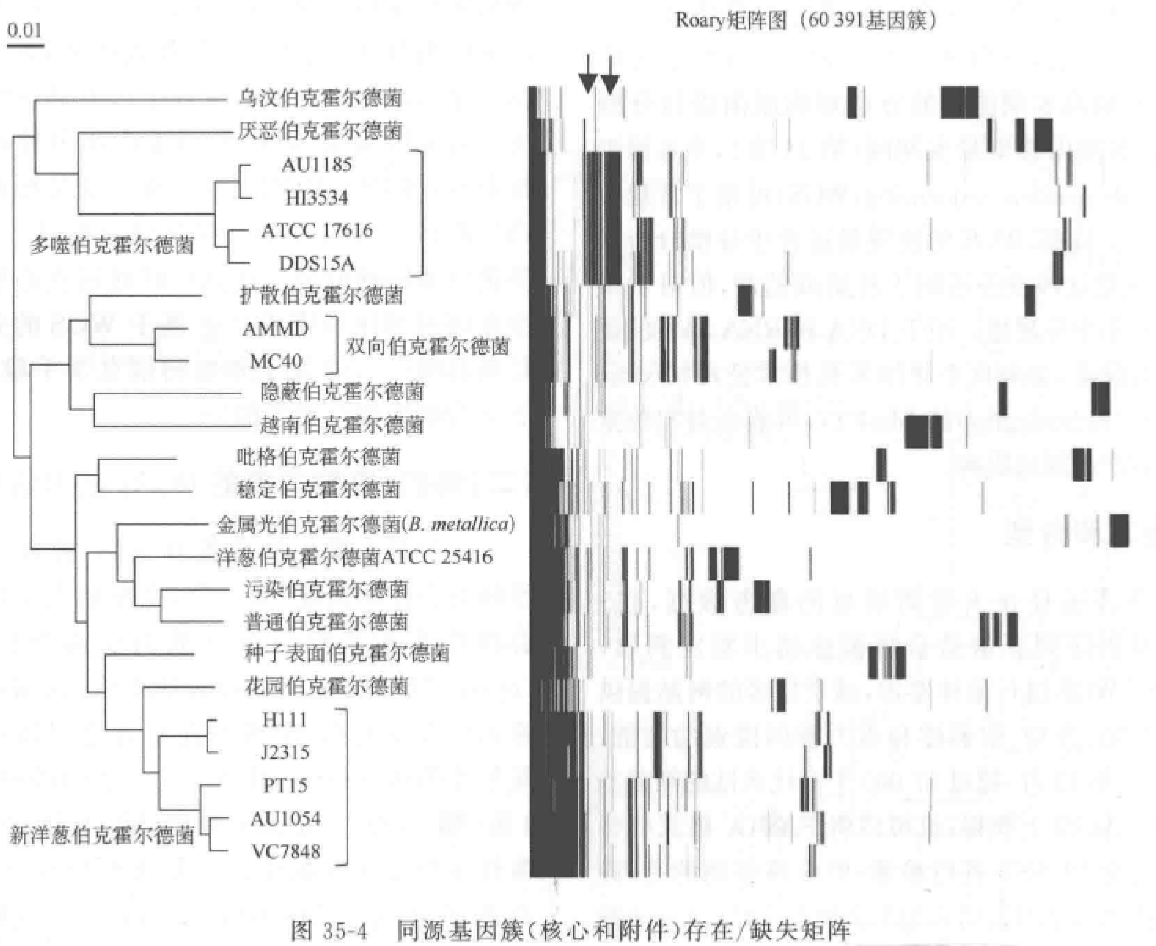


图35-4 同源基因簇（核心和附件）存在/缺失矩阵

注：24菌株的FASTA格式数据来源于GenBank网站用Prokka注释[57]，Roary比较分析[58]的16株洋葱伯克霍尔德菌复合群。邻接树图显示了通过parSNP分析菌株的系统发育关系；条形表示每100个SNP位置有一个替换。在矩阵图中，基因组显示为行，同源基因簇显示为列。蓝色表示基因组中基因簇的存在。基因组中发现的核心基因簇显示在矩阵的左侧，箭头表示多噬伯克霍尔德菌独有的基因簇（即潜在的PCR靶标），见彩插

种可以从流行较低及致病的洋葱伯克霍尔德菌复合群感染的囊性纤维化患者中鉴别出洋葱伯克霍尔德菌的假定PCR方法提供了多个靶点。所选的PCR方法必须在大量临床菌株上进行检测和评估,以明确其敏感性和特异性。最近,一种类似的、用以区分溶血性嗜血杆菌与流感嗜血杆菌的双靶点检测方案也被开发出来[59]。

五、总结

临床细菌学检验正在发生重大转变。临床重要细菌的培养对病原学诊断、流行病学、感染暴发的检测和细菌耐药监测至关重要,但是分子技术可为临床诊断提供支持,并具有快速为临床提供相关诊断信息的潜力。细菌细胞的表型结构对于目前对致病菌的了解和命名是必不可少的,但系统进化谱系是分类的必要条件。针对培养出的细菌MALDI-TOF MS、16S rRNA基因测序和WGS在很多临床微生物实验室中已经取代了大量的表型特征试验。

参考文献请扫二维码查阅

第36章　奈瑟菌属

JOHANNES ELIAS，MATTHIAS FROSCH，ULRICH VOGEL

（单斌　译；张嵘、马筱玲　审校）

一、分类

根据《伯杰系统细菌学手册》第2版，奈瑟菌属（*Neisseria*）隶属于β-变形菌纲，奈瑟菌目，奈瑟菌科[1]。自20世纪80年代以来，由于分子鉴定技术的发展，奈瑟菌科的分类经历了多次修改。由于使用了DNA-rRNA和DNA-DNA杂交技术[2]，提出将奈瑟菌属、莫拉菌属（*Moraxella*）、不动杆菌属（*Acinetobacter*）和冷杆菌属（*Psychrobacter*）归入γ变形菌纲，之后又被16S rDNA基因测序证实[3]。

二、描述

奈瑟菌属细菌大多为直径不超过2 μm的球菌，单个或成双排列。但长奈瑟菌（*N. elongata*）、编织奈瑟菌（*N. weaveri*）、杆状奈瑟菌（*N. bacilliformis*）和沙伊甘奈瑟菌（*N. shayeganii*）[5]例外，这些细菌为短杆状，常见的排列是双杆状或链状。虽然奈瑟菌属细菌为革兰阴性菌，但偶尔存在抗脱色的倾向。脑膜炎奈瑟菌（*N. meningitidis*）可能有荚膜，脑膜炎奈瑟菌及淋病奈瑟菌（*N. gonorrhoeae*）可能有菌毛，但无鞭毛。脑膜炎奈瑟菌是在12种已鉴定的血清群中唯一表达荚膜多糖的菌种[6]。奈瑟菌属的一些菌种，如浅黄奈瑟菌（*N. flavescens*）、干燥奈瑟菌（*N. sicca*）和微黄奈瑟菌（*N. subflava*）可能会产生淡黄色的色素。奈瑟菌属菌在有氧，35～37℃条件下生长最佳。然而，淋病奈瑟菌的分离菌株可在人体低氧部位生长，表明也具有厌氧生长能力，这与其能氧化利用亚硝酸盐有关[7]。脑膜炎奈瑟菌还可在通过对亚硝酸盐的反硝化作用产生的微需氧环境中生长[8]。多数奈瑟菌对营养要求不高，但是致病的淋病奈瑟菌和脑膜炎奈瑟菌均为苛养菌，对不利的培养环境非常敏感，如过高或过低的温度、干燥及碱性或酸性条件。所有奈瑟菌属细菌除长奈瑟菌硝酸盐还原亚种（*N. elongata* subsp. *nitroreducens*）[9]及一些杆状奈瑟菌外[10]氧化酶都是阳性，触酶也都为阳性。奈瑟菌是通过氧化而不是发酵碳水化合物来产酸。某些菌种，如长奈瑟菌和灰色奈瑟菌（*N. cinerea*）不发酵糖。大部分细菌能还原亚硝酸盐。奈瑟菌属细菌定植于人和动物的黏膜。淋病奈瑟菌和脑膜炎奈瑟菌是人类专性病原菌，通常不产生外毒素[1]。所有奈瑟菌属细菌天然具有摄取DNA的能力，表现为高频率的基因水平转移[11]，故基于该菌种不同基因进行系统发育分类，可能会产生不一致的结果[12]。需要注意的是，仅基于16S rRNA基因序列的分类分析必须关注该方法的局限性，该分类方法过去用于定义奈瑟菌属和莫拉菌属的属间和属内关系[3]。基于大量的DNA水平转移，建议使用多位点而不是单位点序列分析进行奈瑟菌种的鉴定[13]。全基因组测序的应用导致奈瑟菌属中某些菌种的分类发生改变，如新命名的口腔奈瑟菌（*N. oralis*）[14]是黏膜奈瑟菌海德堡变种（*N. mucosa* var. *heidelbergensis*），干燥奈瑟菌和恒河猴奈瑟菌（*N. macacae*）被认为是黏膜奈瑟菌（*N. mucosa*）的变种，并且发现浅黄奈瑟菌与微黄奈瑟菌非常接近，甚至于可以合并为一个种[15]。根据Euzeby具有法定分类学地位的原核生物名称目录（List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature，LPSN；网址：http://www.bacterio.net/neisseria.html），奈瑟菌属目前包括30个菌种。

三、流行病学和传播

淋病奈瑟菌可引起淋病，是美国报道的第二常见的疾病[16]。淋病奈瑟菌通常被认为是致病的，人类是其唯一自然宿主，主要通过性行为传播，引起泌尿道、子宫颈、直肠、咽和眼的黏膜表面感染。感染的风险在很大程度上受性行为方式的影响，但可通过使用安全套来降低感染风险[17]。此外，胎儿通过产道时眼也会受到感染。随着20世纪70年代中期美国淋病控制计划的实施，1975－1997年，美国淋病感染率下降74%，到2009年，进一步下降到98.1/100 000的最低记录，但在2015年再次上升至129.9/100 000[16]。然而，由于存在漏报，估计美国每年可有820 000例真实的新发感染[18]。各州之间的报道率差异很大，新罕布什尔州为18.5/100 000，哥伦比亚特区为416.2/100 000。自2013年以来，女性感染率一直低于男性；2015年，女性和男性的感染率分别为107.2/100 000和140.9/100 000。2015年，疾病负担最重的群体是20～24岁的年轻人(546.9/100 000人)；此外，淋病感染率非裔美国人最高(424.9/100 000)，亚洲人最低(22.9/100 000)。

截至2014年，欧盟/欧洲经济区成员国每10万人口中有20例感染病例，疾病负担只是美国的一小部分[19]。然而，2013－2014年感染病例增长了25%，英国、爱尔兰、丹麦和拉脱维亚比例最高，分别为60/100 000、28/100 000、20/100 000和18/100 000。在欧洲，15～24岁的年轻人在报道的病例中占比最高(38%)。男女比为2.7，明显高于美国，其中65%的男性病例为男男性行为者(men who have sex with men，MSM)。

脑膜炎奈瑟菌仅在人类检出，作为寄生和具有潜在侵入性感染的病原体，扮演着双重角色。平均而言，约10%的人类口腔和鼻咽黏膜表面有脑膜炎奈瑟菌定植[20]。欧洲一项大型Meta分析显示[21]，携带率与年龄相关[21]，携带率高峰年龄为19岁，约有1/4的人存在脑膜炎奈瑟菌定植。由于该菌反复定植，人体血清杀菌活性的百分率及对疾病的免疫力随年龄增加而增加。脑膜炎奈瑟菌主要通过口咽分泌物和飞沫传播，反复或密切接触可增加传播机会。然而，在发达国家脑膜炎奈瑟菌的疫情和暴发流行非常少见[22]，但可发生在大规模人群集会以后[23]。其疫情和暴发流行可能在低收入国家更常见，但由于缺乏监测数据，无法估计其发生频率[24]。在脑膜炎奈瑟菌感染人群中仅发生一小部分发展为侵袭性脑膜炎球菌病(invasive meningococcal disease，IMD)，并遵循典型的年龄分布，在发达国家中婴幼儿和青少年发病率最高。除了遗传性宿主多态性[25]，有基础性疾病的个体，如免疫球蛋白缺乏[26]、晚期补体缺陷，包括依库珠单抗(eculizumab)给药后[26-27]及脾切除[28]，都增加了感染的风险。有报道显示，行为风险因素还包括吸烟[29]和接吻[30]。最近，MSM人群感染风险的增加已经引起了越来越多的关注[31]。

IMD在发达国家非常罕见。在美国，发病率从2000年以前的大于1/100 000骤降到2016年的0.12/100 000[32]，71%的病例是由脑膜炎奈瑟菌的血清B群、C群和Y群引起的。2014年，欧洲国家整体发病率略高，为0.5/100 000；马耳他、立陶宛、爱尔兰和英国的通报最高，分别为3.1/100 000、1.8/100 000、1.7/100 000和1.2/100 000[33]。相比之下，所谓脑膜炎高发区的非洲国家，其上报的流行情况显示，感染主要由A群引起，发病率超过300/100 000[34]。近年来，由于A群脑膜炎球菌结合疫苗的使用[35]，IMD发病率显著降低。

已开发多种疫苗可用于IMD的预防。2007年，美国免疫实践咨询委员会(Advisory Committee on Immunization Practices，ACIP)建议对所有青少年(最好是在11～12岁)接种覆盖了血清A群、C群、W群和Y群的脑膜炎四价多糖疫苗[36]，并且在2010年强调对16岁的青少年应进行加强免疫接种[37]。由于20世纪90年代和21世纪初期，C群脑膜炎奈瑟菌感染的高发病率，欧洲一些国家实施结合疫苗接种以遏制C群脑膜炎奈瑟菌感染，最终使得C群脑膜炎的感染率显著降低[38]。脑膜炎奈瑟菌B群荚膜多糖，其成分含(2→8)-α-Neu5Ac(a polysialic acid composed of N-acetylneuraminic acid subunits)，免疫原性差，且人正常组织中也存在(2→8)-α-Neu5Ac，由于担心其可能引起正常组织的自身免疫反应，迄今为止没有继续针对B群的多糖结合疫苗进行研发。最近，2种非荚膜B群脑膜炎球菌疫苗已获得许可，即MenB-FHbp[39]和MenB-4C[40]。疫苗Tru-

menba 及 Bexsero 分别是辉瑞公司和葛兰素史克生物制品公司的产品。最近，疫苗 Bexsero 已被引入英国的婴儿疫苗接种计划[41]。有趣的是，有报道疫苗 Bexsero 的外膜囊泡成分对淋病也有部分预防作用[42]。

四、临床意义

奈瑟菌属细菌对黏膜亲和力强，可从人体中分离出多个菌种，包括淋病奈瑟菌、灰色奈瑟菌、长奈瑟菌、浅黄奈瑟菌、乳糖奈瑟菌（*N. Lactamica*）、脑膜炎奈瑟菌、黏膜奈瑟菌、多糖奈瑟菌（*N. polysaccharea*）、干燥奈瑟菌和微黄奈瑟菌等多个菌种。一些菌种主要来自动物，如动物奈瑟菌（*N. animalis*）、动物口腔奈瑟菌（*N. animaloris*）、动物咬伤奈瑟菌（*N. zoodegmatis*）（来自猫和犬的咽喉）[43]、反硝化奈瑟菌（*N. denitrificans*）（来自豚鼠咽喉）、牙斑奈瑟菌（*N. dentiae*）（来自饲养牛牙斑）、恒河猴奈瑟菌（*N. macacae*）（来自恒河猴的口咽部）和编织奈瑟菌（来自犬的口腔菌群）。与长奈瑟菌类似，新发现的杆状奈瑟菌和口腔奈瑟菌可在人的口腔中定植[10,14]。最近的一项研究表明[44]。脑膜炎奈瑟菌主要定植在咽喉部，而浅黄奈瑟菌和微黄奈瑟菌则定植在舌背；干燥奈瑟菌、黏膜奈瑟菌和长奈瑟菌则显示存在于牙龈斑块中。大多数与人类相关的奈瑟菌是上呼吸道的正常菌群，可引起机会性感染。然而，脑膜炎奈瑟菌和淋病奈瑟菌是例外，因为它们可感染健康人体而致病。此外，动物源性奈瑟菌（动物口腔奈瑟菌、动物咬伤奈瑟菌等）在咬伤人后也可导致人伤口感染[45]。

在男性患者中，单纯由淋病奈瑟菌引起的感染（淋病）通常表现为急性尿道炎。症状主要是有尿道分泌物，有时伴有排尿困难，通常没有尿频、尿急症状，有可能合并包皮腺（Tyson）、尿道腺（Littré）和尿道球腺（Cowper）的感染。此外，无症状感染的发生率为 10%。多数未经治疗的尿道炎在数周后自发消退。淋菌性尿道炎常见的局部并发症包括急性附睾炎、阴茎水肿和腺脓肿。女性的子宫颈内膜是生殖道感染的主要部位。此外，淋病奈瑟菌也会引起尿道、直肠、尿道腺体（Skene）和前庭大腺（Bartholin）感染。性成熟成年女性的阴道鳞状上皮细胞通常不易被感染。与男性感染相比，女性最常见的是无症状感染[46]。另外，在女性患者中，淋病奈瑟菌合并沙眼衣原体和生殖支原体感染也较多见，所以如果出现症状，往往难以正确判断是否为淋病奈瑟菌感染导致的感染。其主要的不适包括阴道分泌物增多、排尿困难和月经期出血。感染加重可能会导致盆腔炎，表现为子宫内膜炎、输卵管炎、输卵管卵巢脓肿和腹膜炎等各种疾病的混合。淋病奈瑟菌可从输卵管直接延伸感染到肝被膜和周围的腹膜后，可发展为急性肝周炎（Fitz-Hugh-Curtis 综合征）。然而仍有超过 80% 的直肠感染无症状，但部分患者有急性直肠炎的表现。口腔性接触可导致咽部的感染，大多无症状，但也可引起明显的咽炎或扁桃体炎[47]。虽然传染性可能比肠道或尿道低，但因感染的隐秘性，以及主要是在 MSM 中流行，使得咽部成为 MSM 性活跃人群中常见的感染部位。成人淋菌性结膜炎通常因自身、外生殖器或内生殖器暴露而感染。如果不及时治疗，可能会迅速发展为感染性角膜溃疡。新生儿结膜炎（新生儿眼炎）是在分娩过程中感染，尤其是胎膜早破和早产的新生儿。过去，新生儿结膜炎是导致新生儿失明的常见原因，可在分娩后用 1% 硝酸银滴剂或抗生素软膏（通常含红霉素）涂抹结膜来预防。淋病奈瑟菌感染可发展为菌血症引起播散性感染，并可能会使人体产生免疫复合物，导致间接免疫损伤。播散性淋病奈瑟菌感染占黏膜感染的比例不到 1%[48] 并且通常表现为化脓性关节炎和多发性关节炎及皮炎，当淋病患者患有腱鞘炎、关节炎和血管炎性皮损时均应高度怀疑[49]。

IMD 一般表现为脑膜炎、急性脓毒症或两者都有。此外，有时也表现为一过性的菌血症、慢性脑膜炎球菌性脓毒症、肺炎（主要是由 Y 群引起）、化脓性关节炎和感染性心内膜炎[50]。脑膜炎的症状差异很大，主要包括颈项强直、头痛、头晕和畏光。没有脓毒症的脑膜炎球菌性脑膜炎（meningococcal meningitis）病死率较低，约 3%[51]。感音神经性听力减退、发育延迟和语音缺陷等后遗症困扰着大多数幸存者，但是比例低于其他急性细菌性脑膜炎[52]。瘀点状皮损是脑膜炎球菌脓毒症的征兆，瘀点可以融合成瘀斑。另外，非紫癜性斑丘疹易与病毒疹混淆，其也与脑膜炎奈瑟菌菌血症有关。脑膜炎球菌感染休克可暴发性发生，病死率高达

30%[53]，其血浆细菌浓度可多达 10^8 个/ml[54]，从而导致细胞因子和血管活性过敏毒素的大量激活。脑膜炎球菌休克综合征的特点是心力衰竭、血管麻痹、毛细血管渗漏和弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)[53]。IMD的并发症包括关节炎、心包炎、脑神经功能障碍、脑膜炎球菌性心包炎，少数患者可出现脑或脊髓梗死。另外，IMD青少年幸存者会有一系列长期后遗症，包括身心健康、生活质量下降和学习成绩较差[55]。慢性脑膜炎奈瑟菌菌血症可无明显菌血症特征，仅表现为反复低热、关节炎及皮疹[56]。100多年来，脑膜炎球菌性肺炎一直被认为是一种少见的临床综合征[57]。大多数脑膜炎球菌性肺炎是由Y群引起，对成人影响较大[58]，有报道显示病毒性感染疾病，特别是流行性感冒[59]，可以促进脑膜炎球菌性肺炎发展。脑膜炎奈瑟菌偶尔可引起急性细菌性结膜炎，也可能是男性尿道炎的病原体[60]。

除了淋病奈瑟菌和脑膜炎奈瑟菌以外，其他奈瑟菌属菌的临床意义在本章的最后"结果的评价、解释和报告"中还有介绍。

五、标本的采集、运输和保存

(一)淋病奈瑟菌(*N. gonorrhoeae*)

用于淋病诊断的培养标本选择取决于患者的性别、性发育程度及性暴露的生理部位。男性患者取样，可用棉签伸入男性尿道前部2 cm，以旋转方式采样。女性患者取样，先清除堵塞子宫颈口的黏液，随后用棉签拭子采集子宫颈管样本。MSM及肛交的女性患者应采集直肠标本，被粪便严重污染的棉拭子必须丢弃。对于有症状的患者，在直肠镜的引导下直接擦拭病变部位采样可提高培养检出率。高危人群的个体，包括MSM，可采集咽拭子标本。育龄期妇女的阴道拭子不适宜用于培养诊断(译者注：育龄期妇女的阴道鳞状上皮细胞通常不易被感染)，但可用于青春期前的女性，如果处女膜完好无损，则应从阴道口采集标本。

涤纶(聚对苯二甲酸乙二酯)、人造丝(黏胶)、聚氨酯和尼龙棉签都可用于采集淋病奈瑟菌培养标本，而海藻酸钙棉签[61]、棉球和油性润滑剂(译者注：棉签和油性润滑剂含有不饱和脂肪酸)会抑制淋病奈瑟菌的生长。直接接种可最大限度获得活的淋病奈瑟菌，但并不总是可行或可能的。在这种情况下，可用Amies-based半固体或液体转运培养基运输棉签拭子到实验室。由于半固体Amies-based培养基在室温下保存24 h和48 h[62]性能差异较大，建议在室温下数小时内快速转运以最大限度培养细菌。有报道显示，冷藏(4～8℃)可提高某些但不是全部半固体转运培养基中淋病奈瑟菌的生存率[63]。然而，最近对Amies液体培养基的研究一致表明，冷藏可促进已保存24 h或更长时间后培养菌的复苏。商用的尼龙植绒棉签和Amies液体培养基组合包括δswab(Deltalab, Barcelona, Spain)[64]、Sigma-Transswab Purflock(Medical Wire and Equipment, Corsham, United Kingdom)[65]和Eswab(Copan, Brescia, Italy)[66]。

淋病奈瑟菌的保存和转运超过24 h也可通过直接将标本接种到运送培养系统中来实现。该系统通常是由固体培养基和含有可产生 CO_2 的可重复使用的密闭容器组成，采集标本后拭子可直接接种在固体培养基上。含有柠檬酸和碳酸氢钠的片剂在潮湿的环境中可产生富含 CO_2 的空气。Gono-Pak和JEMBEC(John E. Martin Biological Environmental Chamber)系统(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ)就是利用了这一原理。

由于有报道显示海藻酸钙可抑制PCR扩增，采用分子方法检测淋病奈瑟菌时，与采集培养标本一样，使用Rayon或涤纶拭子采集标本最佳[67]。铝棒棉签的抑制作用有争议，建议结合所使用的分子生物学试剂盒进行初步验证后采用。专门设计用于分子生物学检测的标本采集和转运系统有Digene女性拭子标本采集和运输试剂盒(Qiagen Inc., Valencia, CA)和STD拭子标本采集和运输试剂盒(Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)。某些分子诊断试剂盒，如BD MAX UVE标本采集试剂盒(Becton, Dickinson and Company)也可用于尿和阴道拭子的检测。

(二)脑膜炎奈瑟菌(*N. meningitidis*)

可用于脑膜炎奈瑟菌检测的标本包括血液、脑脊液(CSF)、鼻咽和咽拭子、支气管肺泡灌洗液、关节穿刺液、尿道和子宫颈拭子、穿刺液和活

检组织标本。生殖器和直肠标本可使用上面所述的收集和接种程序(译者注:此句话 MCM 11 版无,为 MCM 12 版新增加的,脑膜炎奈瑟菌主要定植于人的口腔和鼻咽黏膜表面,可引起上述部位及血流感染,但生殖器和直肠会否成为脑膜炎奈瑟菌的感染部位有待商榷)。用于测定是否携带脑膜炎球菌的咽拭子标本最好通过口腔从咽后壁取样,并在取样后直接接种到培养基上[68]。另外,拭子也可放入 Amies-based 转运系统中,且最好在标本采集后 5 h 内接种,尽管这可能会降低复苏率[21]。脑膜炎奈瑟菌和淋病奈瑟菌在商品化的血液培养基中的生长会受到其中抗凝剂聚茴香脑磺酸钠的不利影响[69],可通过添加明胶或使用血液裂解系统来降低其抑制作用[70]。

(三)脑膜炎球菌培养操作实验室生物安全

实验室工作人员在处理脑膜炎球菌时可能会感染致命的脑膜炎球菌[71],工作人员暴露于含有脑膜炎球菌的液滴或气溶胶时风险最高[71]。处理脑膜炎球菌活菌应在Ⅱ级生物安全柜内操作。不小心暴露的实验室人员应给予预防性用药。建议对经常接触脑膜炎球菌分离株的实验室工作人员进行免疫接种[72]。

六、直接检查

(一)显微镜检查

如果可能的话,应针对尿道炎的患者采集标本进行直接涂片革兰染色镜检,涂片不宜使用用于培养的拭子,而应该用不同的拭子来涂片。男性淋菌性尿道炎的初步诊断是根据显微镜下观察到典型的革兰阴性双球菌或多形核的白细胞内存在革兰阴性双球菌。显微镜检查的敏感性取决于取材部位,男性尿道标本涂片敏感性最高,可达到89%[73]。然而,对于子宫颈涂片和直肠涂片标本,敏感性分别下降到51%和54%[73]。显微镜检查不能用于咽部淋病奈瑟菌感染的诊断。然而,正常无菌部位标本必须做显微镜检测。

所有怀疑细菌性脑膜炎的病例都需要将脑脊液标本送到实验室进行革兰染色检查。显微镜下观察到典型的革兰阴性双球菌足以推测诊断脑膜炎球菌性脑膜炎(图 36-1)。如果脑脊液标本量超过 1 ml,标本应以相对离心力 1000 g 离心 10 min,取沉渣用于显微镜观察和培养检查。使用细胞离心机离心标本,可增加显微镜检查的敏感性。脑膜炎奈瑟菌感染患者的脑脊液标本在涂片革兰染色检查时,通常可观察到典型的多形核白细胞,并在其细胞内、外可见到革兰阴性双球菌。细菌可能存在抗脱色。

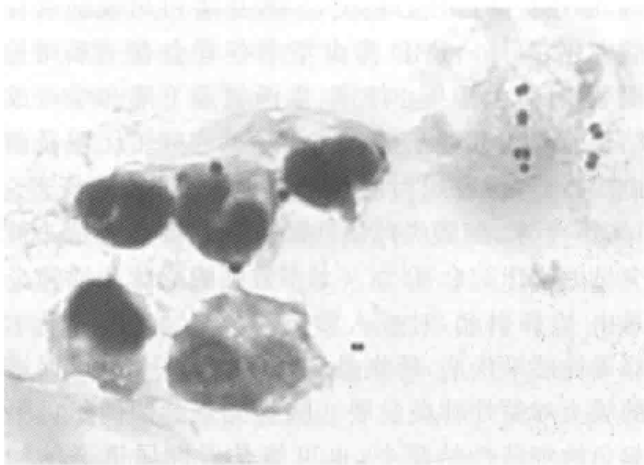


图 36-1 脑膜炎球菌性脑膜炎患者脑脊液涂片革兰染色,见彩插

(二)抗原检测

目前用于检测脑膜炎球菌性脑膜炎商品化的抗原检测试剂盒临床应用价值有限,仅在资源有限的地区使用。乳胶凝集试验的试剂由已包被单克隆抗体的乳胶颗粒组成,用于检测常见血清型的荚膜多糖,商品化的试剂有:Pastorex 脑膜炎检测试剂盒(Alere Inc.,Waltham,MA)和 Wellcogen A、C、Y 型脑膜炎奈瑟菌检测试剂盒,以及 W135 检测试剂盒(Oxoid Ltd.,Basingstoke,United Kingdom)。此类试验都具有一定的敏感性和特异性[74],但不能用于检测不常见的血清型[75]。对于标本量较少的实验室,采购、储存抗原检测试剂盒的成本超过了其在服务患者中所产生的收益。

目前,用于淋病奈瑟菌感染诊断的商品化抗原检测试剂盒还不具备足够的敏感性和特异性。

(三)核酸检测

1. 淋病奈瑟菌(*N. gonorrhoeae*) 核酸扩增试验(nucleic acid amplification test,NAAT)用于检测临床标本中的淋病奈瑟菌具有快速、敏感性高、不受细菌是否存活影响等优点。迄今为止,大

多数商品化的 NAAT 试剂盒主要是针对淋病奈瑟菌和沙眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*）进行检测。Aptima Combo 2（AC2，Gen-Probe，San Diego，CA）是第 2 代采用转录介导扩增技术（transcription-mediated amplification，TMA）检测淋病奈瑟菌的 16S rRNA，并使用化学发光标记单链 DNA 探针进行扩增产物检测的试剂盒。Aptima GC 试剂盒是采用相同技术的确证试验，采用了与 AC2 相同的捕获探针，但它针对的是 rRNA 亚基的一个稍微不同的区域。该试验的实验室性能评价较好，澳大利亚的评价显示其敏感性和特异性均高于一代试剂盒（如 Roche Amplicor）[76]。尽管患病率较低[77]，对 60 000 名妇女尿和宫颈拭子用 AC2 和 Aptima-GC 试验作为确证试验，结果表明其阳性预测值（positive predictive value，PPV）为 97%。在一项多中心的研究中，泌尿生殖道标本的 PPV 在 75%～100%波动[78]。多项研究报道，首段尿[79]、阴道[80]、直肠[81-82]和咽部[82-83]标本的 AC2 特异性均超过 94%。雅培 CT/NG 实时荧光检测试剂盒（Abbott Molecular，Maidenhead，Berkshire，United Kingdom）及 Cobas 4800 CT/NG 试剂盒（Roche Molecular Systems，Pleasanton，CA）也进一步增加到核酸扩增检测阵营，其靶基因分别是淋病奈瑟菌不透明（opacity，*Opa*）基因的一个区域[84]和 DR9 直接重复区[85]。应用 2 种方法对几千例临床标本进行检测，均显示出较高的敏感性（>96%）和特异性（>99%）[86-87]。Cepheid CT/NG Xpert 快速 PCR 检测试剂盒（Xpert；Cepheid，Sunnyvale，CA）针对几个未公开的目的基因序列进行检测，在总体患病率为 2.3%的大样本人群中获得了较高的 PPV（>91%）[88]。此外，BD Max CT/GC/TV 检测试剂盒（Becton，Dickinson 和 Company）针对未公开的 DNA 序列进行检测，在不同样本类型（阴道和子宫颈内拭子、尿）中有高度特异性（≥99.5%）。然而，对于男性和女性尿的敏感性分别只有 89%和 80%[89]。

总之，核酸扩增试验比培养诊断有更多的优势，但也有一系列明显的局限性。主要优势是比细菌培养敏感性更高，也无须严格的标本采集和运送条件，这一点已在众多临床研究中得到了证实[81-83,90]。上述所有试验均获美国 FDA 批准。目前，美国 FDA 批准的核酸扩增试验包括 Amplicor、Abbott Real-Time、AC2、ProbeTec、Cobas 4800 CT/NG 和 Xpert 试验。大部分核酸扩增试验允许对男性尿标本进行检测，表 36-1 列出了已批准的试验及其适用的标本类型。重要的是，目前没有对口咽、直肠、眼或小儿标本进行检测的核酸扩增试验。核酸扩增试验主要的局限性包括：成本高、缺乏抗生素耐药数据[91]及特异性不确定等[92]。当使用这些方法对一批奈瑟菌和莫拉菌进行鉴定时，大多数试验的特异性为 85.9%～99.1%[92]，意味着对患病率约 1%甚至更低的群体进行检测时，目前使用的大部分核酸扩增试验的 PPV 可能达不到 90%的推荐值[93-94]。患者标本中存在抑制物时试验也可能会受到影响，如合并沙眼衣原体[91]或阴道毛滴虫[89]感染患者的尿标本[95]中存在竞争性扩增。手工核酸提取、扩增和检测等步骤要求实验室具备严格的质量控制和员工培训。然而，最新的商品化检测试剂，如 AC2、Abott RT 和 Cobas 4800 CT/NG 试验，可被整合到全自动分子检测系统如 Panther（Hologic，Bedford，MA），m2000（Abbott Molecular）和 Cobas 4800（Roche Diagnostics，Rotkreuz，Switzerland）。BD MaxCT/GC/TV 只能用于 BD Max（Becton，Dickinson and Company）自动化平台，而 Xpert 检测是操作最简单、检测周转时间最短的即时检验方法[88]。

2. 脑膜炎奈瑟菌（*N. meningitidis*） 一些未公开发布的检测方法，可用于对 IMD 进行非培养诊断，尤其在因已使用抗生素治疗或因不利的运输条件造成培养阴性的情况下特别有用。用于分子诊断的 DNA 靶基因包括 *ctrA*[96]、多聚唾液酸转移酶基因（polysialyltransferase genes）[97-98]、*porA*[99]、*porB*[100]、*fetA*[101]、*sodC*[102]和用于多位点序列分型（multilocus sequence typing，*MLST*）的管家基因。特别地，已经开发出针对 *ctrA* 和 *sodC* 靶基因的 qPCR 检测方法[102-103]。除了有助于脑膜炎球菌病的实验室诊断，多聚唾液酸转移酶基因（原 *siaD*；最近更名为 *csb*、*csc*、*csw* 和 *csy*）也可用于血清分型（B、C、W 和 Y 群），而 *porA*、*porB*、*fetA* 和管家基因可进行非培养分型[22]。少数由无荚膜脑膜炎奈瑟菌引起的 IMD 病例，*ctrA* 检测结果为阴性[104]。生物梅里埃（bioMérieux）的微阵列脑膜炎/脑炎芯片是目前美国 FDA 唯一批准的针对未公开的脑膜炎球菌

DNA序列进行检测的分子试验。除脑膜炎奈瑟菌外，还能检测其他13种病原体细菌和病毒。除病例报告外[105]，迄今为止尚未发表有关脑膜炎球菌DNA检测的试验性能评估。对微阵列脑膜炎/脑炎芯片的一项多中心评估未发现任何IMD病例[106]。

表 36-1 用于淋病奈瑟菌检测的商品化核酸扩增试验(NAAT)

试验名称	生产厂家	方法类别[a]	基因靶点	标本类型	实验平台	参考文献
APTIMA Combo 2 and GC	Gen-Probe	TMA	16s rRNA	尿，子宫颈拭子，男性尿道拭子，阴道拭子	Tigris，Panther (Hologic)	76-83,88,92
Abbott RealTime CT/NG	Abbott Molecular	PCR	*Opa* 基因	尿，子宫颈拭子，男性尿道拭子	m2000	84,86,87,92
Cobas 4800 CT/NG	Roche Molecular Systems	PCR	直接重复区 DR9	男性尿，阴道拭子	Cobas 4800	85-87,92
Cepheid CT/NG Xpert	Cepheid	PCR	多个未公开位点	尿，子宫颈拭子，阴道拭子	GeneXpert	88
BD Max CT/GC/TV	Becton，Dickinson and Company	PCR	多个未公开位点	尿，子宫颈拭子，阴道拭子	BD Max	89

注：TMA. 转录介导扩增技术

七、分离培养

淋病奈瑟菌的培养最好使用巧克力琼脂，其他一些寄生菌在该琼脂也能生长。为了从黏膜和其他有菌部位分离淋病奈瑟菌，已经开发了几种含有抑菌剂的选择性培养基。培养基分别含有可抑制革兰阳性菌和革兰阴性菌生长的万古霉素和多黏菌素。Thayer 和 Martin[107]最初研发的培养基以巧克力琼脂为基础，除了上述抗生素，还加入制霉菌素抑制酵母菌的生长。改良 Thayer-Martin 培养基中添加了甲氧苄啶，可抑制变形杆菌迁延生长。Martin-Lewis 培养基用茴香霉素(anisomycin)代替制霉菌素，增加了对白念珠菌的抗菌活性。进一步的改良培养基包括 GC-Lect 琼脂(Becton，Dickinson and Company)，通过添加林可霉素可防止二氧化碳噬纤维菌属菌和对万古霉素耐药的革兰阳性菌的污染。此外，GC-Lect 琼脂中降低万古霉素浓度，可提高罕见的对万古霉素敏感的淋病奈瑟菌的检出率[108]。与上述培养基相比，New York City 培养基在蛋白胨玉米淀粉琼脂中添加酵母液、枸橼酸、马血浆和裂解的马血红细胞。该培养基添加的抗生素有万古霉素、多黏菌素、两性霉素B和甲氧苄啶。

标本应接种于预温的或室温下的培养基。接种后，平板应置于35～37℃、3%～7%的CO_2及湿润的环境中培养。这些可在商品化的带有加湿器的二氧化碳培养箱中完成。使用白色无味的蜡烛熄灭罐也能产生潮湿、富含CO_2的培养环境。每天都应观察生长情况，并至少观察72 h。

为了从无菌标本如脑脊液或关节液中培养脑膜炎奈瑟菌，标本应接种于绵羊血琼脂和巧克力琼脂。黏膜表面标本(如呼吸道标本)也必须接种于能抑制大部分寄生奈瑟菌生长的选择性培养基(见上文)。脑膜炎奈瑟菌培养孵育条件与淋病奈瑟菌相同。然而，与淋病奈瑟菌相比，脑膜炎奈瑟菌在固体培养基上更容易生长，其几乎总是生长在血琼脂平板上。实验室必须在24、48和72 h观察培养基是否有可疑菌落生长，72 h后无生长方可报告培养阴性。

八、鉴定

(一)初步筛查鉴定

1. 菌落形态 巧克力琼脂培养48 h后，淋病奈瑟菌菌落直径达到1 mm，为灰白、不透明、有光泽、凸起的菌落。菌落形态可因菌毛和不透明蛋白的存在而发生改变。有菌毛和不透明蛋白的淋病奈瑟菌表现为有皱纹、轮廓分明、边缘清晰，而无菌毛的菌落边缘更加扩散，更有光泽。由于菌毛阶段

快速的变化，初次培养的菌落形态可能会不定。

血琼脂培养基上生长 18 h 后，脑膜炎奈瑟菌菌落的边缘光滑完整，直径约 1 mm。灰色、凸起、有光泽，偶尔为黏液状。菌落下面的血琼脂可能变为灰绿色。

2. 显微镜下形态　疑似淋病奈瑟菌和脑膜炎奈瑟菌的菌落必须进行革兰染色，以确认是否存在革兰阴性双球菌。在细菌出现自溶之前，培养 24 h 内的菌落可得到一致的结果。对于在选择培养基上生长的可疑菌落，需革兰染色镜检排除莫拉菌属菌，如奥斯陆莫拉菌（*Moraxella osloensis*）、不动杆菌属和偶尔生长的金氏菌属细菌。当不动杆菌不能通过革兰染色与脑膜炎奈瑟菌和淋病奈瑟菌区别开来时，可以通过不动杆菌氧化酶试验为阴性进行鉴别（见下文）。

3. 氧化酶试验　疑为奈瑟菌属的细菌必须进行氧化酶试验。淋病奈瑟菌和脑膜炎奈瑟菌氧化酶均为阳性。采用滤纸法时，将氧化酶试剂（1%盐酸二甲基对苯二胺或 1%盐酸四甲基对苯二胺）滴加在滤纸上，用小木棍蘸取细菌涂布于滤纸上（镍铬合金接种环可能造成假阳性反应）。新鲜的分离菌株在 10s 内产生深紫色为阳性。商品化的试纸条（如 Microbact 氧化酶试纸条，Oxoid，UnitedKingdom）也是不错的选择。

（二）细菌鉴定

1. 碳水化合物利用试验　奈瑟菌属菌是通过氧化而不是发酵分解碳水化合物产酸。淋病奈瑟菌唯一能分解利用的碳水化合物是葡萄糖，而脑膜炎奈瑟菌还能分解麦芽糖（表 36-2）。然而，有少数淋病奈瑟菌[109]和脑膜炎奈瑟菌[110]不能在含碳水化合物的培养基上产酸。同时，一些不分解糖的菌种，包括灰色奈瑟菌、浅黄奈瑟菌和长奈瑟菌完全不利用糖类产酸。在大多数常规实验室中，传统的胱氨酸胰蛋白琼脂（Cystine Tryptic Agar Sugar，CTA）已被快速碳水化合物利用试验所取代。这些试剂被制成商品试剂盒，包括 ApiNH（BioMérieux，Marcy-l'Etoile，France）和 RapIDNH（Remel，Lenexa，KS）试剂盒，其可在 4h 内得到结果。

表 36-2　医学相关奈瑟菌属特性[a]

菌种	菌落形态	选择性培养基上生长	利用糖产酸					硝酸盐还原	利用蔗糖合成多糖	参考文献
			葡萄糖	麦芽糖	乳糖	蔗糖	果糖			
动物口腔奈瑟菌（*N. animaloris*）	CR	ND	+	0	0	0	ND	+	ND	163
杆状奈瑟菌（*N. bacilliformis*）	R	0	0	0	0	0	ND	V	ND	10
灰色奈瑟菌（*N. cinerea*）	C	V	0	0	0	0	0	0	0	
长奈瑟菌（*N. elongata*）	C									1
长亚种（subsp. *elongata*）		0	0	0	0	0	0	0	0	
糖酵解亚种（subsp. *glycolytica*）		0	(+)	0	0	0	0	0	0	
硝酸盐还原亚种（subsp. *nitroreducens*）		0	0	0	0	0	0	+	0	
浅黄奈瑟菌（*N. flavescens*）	C	0	0	0	0	0	0	0	+	
淋病奈瑟菌（*N. gonorrhoeae*）	C	+	+	0	0	0	0	0	0	
乳糖奈瑟菌（*N. lactamica*）	C	+	+	+	+	0	0	0	0	
脑膜炎奈瑟菌（*N. meningitidis*）	C	+	+	+	0	0	0	0	0	
黏膜奈瑟菌（*N. mucosa*）	C	0	+	+	0	+	+	+	+	
口腔奈瑟菌（*N. oralis*）	C	ND	+	+	V	V	V	+	ND	14
多糖奈瑟菌（*N. polysaccharea*）	C	V	+	+	0	V	0	0	+	
干燥奈瑟菌（*N. sicca*）	C	0	+	+	0	+	+	0	+	
微黄奈瑟菌（*N. subflava*）	C									1
黄色生物变种（biovar *flava*）		V	+	+	0	0	+	0	0	
深黄生物变种（biovar *perflava*）		V	+	+	0	+	+	0	+	
微黄奈瑟菌属（biovar *subflava*）		V	+	+	0	0	0	0	0	
编织奈瑟菌（*N. weaveri*）	R	ND	0	0	0	0	0	0	ND	176
动物咬伤奈瑟菌（*N. zoodegmatis*）	CR	ND	V	0	0	0	ND	V	ND	163

注：[a]0. 阴性；+. 阳性；R. 杆状；C. 球状；CR. 球杆状；ND. 未测试；V. 不定

2. 酶底物显色试验 鉴定淋病奈瑟菌可利用酶底物显色试验检测酶活性来初步鉴定。检测的酶通常包括β-半乳糖苷酶(β-galactosidase)、γ-谷氨酰氨肽酶(γ-glutamylaminopeptidase)和脯氨酸亚氨肽酶(prolyl-iminopeptidase, PIP),分别对乳糖奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌和淋病奈瑟菌的鉴定具有特异性。用于上述酶检测试验的底物,如溴氯吲哚-β半乳糖苷(bromo-chloro-indolyl-β-galactoside)或半乳糖苷(galactopyranoside)、γ谷氨酰硝基苯胺(γ-glutamylnitroanilide)和脯氨酸甲氧基萘酰胺(proline-methoxynaphthylamide)在酶作用下的阳性反应分别为蓝色、黄色和红色。上述3种酶也可以用试剂盒如 GonoCheck II(EY Laboratories Inc., San Mateo, CA)和 Neisseria PET (BioConnections, Wetherby, United Kingdom),以及滤纸试验,如 Remel BactiCard *Neisseria* (Remel, USA)在一个试管内同时完成检测。

一项研究报道,这些试验应用于确证淋病奈瑟菌敏感性低[111]。尤其是最近英格兰和威尔士[112]的一项调查显示,在脯氨酸亚氨肽酶(PIP)阴性的淋病奈瑟菌株中,假阴性的结果占分离株的4%。此外,脑膜炎奈瑟菌可能偶尔会出现γ-谷氨酰氨基肽酶阴性[109]。同样,Remeld 的鉴定卡可将微黄奈瑟菌(*N. subfl*)和金氏菌属菌误鉴定为淋病奈瑟菌[113]。并且最近发现的口腔奈瑟菌[15]中存在的β-半乳糖苷酶影响了上述试验的有效性,因此只能提供初步的菌种鉴定。

3. 培养菌株的免疫学方法 所有用于淋病奈瑟菌培养物确认的商用试剂都是依据一组单克隆抗体检测淋病奈瑟菌蛋白Ⅰ(其是ⅠA和ⅠB的变异体)。Phadebact 单克隆 GC 试验就是利用已灭活的金黄色葡萄球菌的A蛋白的 Fc 段结合区包被单克隆抗体所进行的凝集试验。据报道其与卡他莫拉菌、灰色奈瑟菌和乳糖奈瑟菌存在交叉反应。然而,最近越来越多的研究发现该方法对于淋病奈瑟菌培养物的确认具有很高的敏感性和特异性[111,114]。BD 公司的 GonoGenⅡ试剂盒(Becton, Dickinson and Company)是一种将抗体吸附于金属溶胶颗粒,可使试剂变为玫红色的比色测试。已观察到其与乳糖奈瑟菌和脑膜炎奈瑟菌会产生假阳性反应[115]。此外,GonoGenⅡ试剂盒中的溶解缓冲液提取蛋白Ⅰ不充分[111],从而会导致一些菌株出现假阴性反应。然而,通过延长提取物的重复试验,可提高该试验的敏感性和特异性[111]。

4. 试验组合鉴定系统 几种试剂盒将碳水化合物利用试验和酶的直接测定组合起来分析,可应用于奈瑟菌属细菌的快速鉴定。API NH 试剂条是利用13个小型生化试验鉴定奈瑟菌属、嗜血杆菌属和黏膜炎莫拉菌(*M. catarrhalis*)。该试剂条包括4个糖利用试验(包括葡萄糖、果糖、麦芽糖和蔗糖)、8个酶底物试验及1个青霉素酶试验。相比之下,RapID NH(Remel, Lenexa, KS)试剂条只包含2个碳水化合物利用试验(葡萄糖和蔗糖)、10个酶底物试验及1个刃天青还原抑制试验。在 API NH 和 RapID NH 试剂盒中分别接种4和3麦氏单位浓度的细菌悬液,置于35~37℃分别孵育2 h和4 h就可判读结果。API NH 使用较高浓度的细菌接种量或许是其敏感性稍高于 RapID NH 的原因[111]。全自动细菌鉴定及药敏分析系统 Vitek Ⅱ(bio-Mérieux)也可用于奈瑟菌属菌的鉴定。其 NHI 卡包含30种生化试验。由于缺乏葡萄糖利用试验,Valenza 和其同事报道了该仪器将1株淋病奈瑟菌误鉴定为灰色奈瑟菌的错误案例[110]。在另一项研究中,所有的淋病奈瑟菌株鉴定都正确,但其中有6%为低鉴定率[116]。

5. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS) 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)应用于细菌病原菌的鉴定已引起广泛的关注。一项开创性的研究分别对29株淋病奈瑟菌、13株脑膜炎奈瑟菌和15株其他奈瑟菌进行分析,结果显示细菌的质谱特征足以用于对致病性奈瑟菌菌种进行鉴定[117]。进一步的研究评估了两种主要质谱仪的性能,结果证实质谱可用于奈瑟菌的鉴定,但该研究仅包括了很少的菌株[118-119]。另外一项针对脑膜炎奈瑟菌的研究证实了 MALDI-TOF MS 能正确鉴别100株细菌,此外还能将它们归属为不同克隆复合群[120]。此外,MALDI-TOF MS 被认为应用于淋病奈瑟菌鉴定至少与 API NH 一样准确[121];同样,扩充其数据库可提高鉴定能力[122]。然而,也有将多糖奈瑟菌[123]和灰色奈瑟菌[124]误鉴定为脑膜炎奈瑟菌的报道。是否可以通过更新质谱数据库来提高其鉴定准确性仍有待观察。因此,目前用 MALDI-TOF MS 鉴定脑膜炎奈瑟菌应辅以其他方法。

6. DNA 测序　美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)已公布利用 DNA 靶序列鉴定细菌和真菌的解释性标准[125]。大多数情况下，对足够大的 16S rRNA 基因片段进行测序并将结果与数据库相比对，即可将奈瑟菌属细菌鉴定到种。然而，使用 16S rRNA 基因测序，同一菌属中不同菌种之间的序列差异可能仅为 1%。此外，还发现一种非常罕见的案例，即淋病奈瑟菌 16S rDNA 基因水平转移到脑膜炎奈瑟菌[126]，表明 16S rRNA 基因测序与任何其他单一靶点的方法一样，在奈瑟菌属的鉴定中并不是完全可靠的。此外，已显示 50S 核糖体蛋白 L6(*rplF*)的 413-*bp* 基因片段已证明比 16S rDNA 基因具有更高的分辨率[127]。多位点的方法包括 7 位点[128]、核糖体[13]和核基因组多位点序列分型也是奈瑟菌属内进行菌种分类鉴定的可靠方法。

九、分型系统

(一)淋病奈瑟菌(*N. gonorrhoeae*)

用于淋病奈瑟菌的分型方法包括 *opa* 基因分型、脉冲场凝胶电泳、多抗原序列分型和多位点序列分型。尽管 *opa* 基因分型和脉冲场凝胶电泳分辨率都较高，但它们既烦琐又不便携。另一方面，淋病奈瑟菌多抗原序列分型是通过对高度多态性抗原 Por 和 TbpB[转铁蛋白结合蛋白 β 亚基(β subunit of transferrin-binding protein)]的编码区进行测序[129]，是一种简便的淋病奈瑟菌序列分型方法。未来下一代测序技术可能用于多抗原序列分型和 MLST 基因分型，从而取代上述方案。

(二)脑膜炎奈瑟菌(*N. meningitidis*)

脑膜炎奈瑟菌是高度变异的细菌，已有多项技术被开发用来检测其变异。最简单的分型方法是根据荚膜多糖的性质来分型，共分为 12 种血清群，其中包括 A、B、C、E、H、I、K、L、W、X、Y 和 Z 群[6]。常见的血清群分型是利用一组商品化的血清(由 Remel, Lenexa, KS, 或 Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ 提供)进行玻片法凝集。基于 PCR 的血清分群方法(也称为"基因分群")，对寄生菌的鉴定更可靠[130,131]。以高度可变的外膜蛋白 DNA 序列为基础的分型方案可进一步实现亚群分型，该方案已在整个欧洲范围得到统一[132](表 36-3)。全基因组测序用于感染暴发分析[133-134]，将在不久的将来取代上述方法。借助免费的 BIGSdb 数据库网站(译者注：细菌基因组序列数据库，Bacterial Isolate Genome Sequence Database；网址：https://bigsdb.readthedocs.io/en/latest/)可对细菌核糖体蛋白序列、抗原序列和核心基因组序列进行分析[135]。

表 36-3　脑膜炎奈瑟菌的分子分型方法[a]

目标	方法		价值/用途
	培养分离菌	原始标本	
血清群	玻片凝集	PCR(警告：血清型 W 和 Y 群需要测序[4])	疫苗预防
PorA	PCR，DNA 测序	PCR，DNA 测序	常规精细分型(结合 FetA 和血清群)
FetA	PCR，DNA 测序	PCR，DNA 测序	常规精细分型(结合 PorA 和血清群)
PorB	PCR，DNA 测序		附加分型方法
管家基因：*abcZ*，*adk*，*aroE*，*fumC*，*gdh*，*pdhC*，*pgm*(MLST)	PCR，DNA 测序	PCR，DNA 测序	全球流行病学；菌种状况
penA	PCR，DNA 测序		青霉素敏感性减低菌株的确认
H 因子结合蛋白	PCR，DNA 测序		新一代流脑疫苗的可能覆盖率分析

注：[a] PorA. porin A，孔蛋白 A；FetA. ferric enterobactin transport protein A，铁肠杆菌素转运蛋白 A；PorB. porin B，孔蛋白 B；abcZ. putative ABC transporter，假定的 ABC 转运蛋白；adk. adenylate kinase，腺苷酸激酶；aroE. shikimate dehydrogenase，莽草酸脱氢酶；fumC. fumarate hydratase，延胡索酸酶；gdh. glucose-6-phosphate dehydrogenase，葡糖-6-磷酸脱氢酶；pdhC. pyruvate dehydrogenase subunit，丙酮酸脱氢酶亚基；pgm. phosphoglucomutase，葡糖磷酸变位酶；*penA*. gene encoding the penicillin binding protein，编码青霉素结合蛋白基因

十、血清学试验

血清学试验主要用于疫苗接种后对 IMD 的防护或血清流行病学调查。但无助于确认是否存在有脑膜炎奈瑟菌侵入性疾病，因为无症状携带也会引起滴度升高。血清杀菌试验是使用体外补体，如幼兔或人的补体，来检测杀菌效价的功能性试验。目前它被视为对所有血清群的疫苗保护评估的最佳替代试验[136]。已开发用于研究 A、C、W 和 Y 群荚膜抗原的免疫应答的检测方法。此外，血清杀菌试验可对接种疫苗 Bexsero 和疫苗 Trumenba 后产生的抗体进行测定。除了血清杀菌试验，还可以通过酶联免疫吸附试验（ELISA）或磁珠法（bead assays）来检测血清 A、C、W 和 Y 群的血清 IgG 浓度[137]。

十一、抗菌药物敏感性试验

（一）淋病奈瑟菌（*N. gonorrhoeae*）

目前，淋病奈瑟菌抗菌药物敏感性试验只能使用培养的方法进行。因标准化机构之间推荐的方法、折点和定义不同，限制了报告之间的直接对比性。尽管 CLSI 建议使用特定培养基进行纸片扩散法或琼脂稀释法[138]，但欧洲药敏试验委员会（European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing，EUCAST）仅推荐 MIC 法。然而，EUCAST 目前没有具体的操作程序和特定培养基[139]；对于诸如浓度梯度测试之类商用产品（如梯度试验），EUCAST 建议遵循制造商的使用说明。

淋病奈瑟菌对多种抗生素耐药性的增加会增加对淋病的治疗和防控难度。20 世纪 70 年代，青霉素一直是首选的治疗药物，但因青霉素酶[140]和染色体介导的青霉素耐药性的出现和增加，导致临床放弃青霉素作为首选治疗方案。同样，质粒和染色体介导的对四环素类耐药导致该药在 20 世纪 80 年代被广谱头孢菌素类抗生素代替，随后又被氟喹诺酮类药物代替。然而，20 世纪 90 年代在东南亚地区出现了对氟喹诺酮类耐药的菌株[141]，并广泛蔓延到包括美国在内的许多国家[142]。自 2007 年 4 月以来，在美国，氟喹诺酮类药物不再被推荐用于治疗淋病奈瑟菌的感染[143]。根据《2015 年性传播疾病监测报告》，39.6%的菌株对青霉素、四环素、环丙沙星或这些抗菌药物的多重耐药[16]。最近，由于 *penA* 基因的突变，淋病奈瑟菌对第 3 代头孢菌素也产生了耐药[141]。美国 CDC 和欧洲 CDC 头孢曲松和头孢克肟的折点非常接近，易于比较。然而，定义不同，美国 CDC 将头孢曲松 MIC≥0.125 mg/L 的菌株表述为“MIC 升高”，而 EUCAST 判断为“耐药”。美国 CDC 和欧洲 CDC 对头孢克肟的折点标准是相同的，将 MIC≥0.25 mg/L 的菌株描述为“MIC 升高”，而 EUCAST 将 MIC>0.125 mg/L 的菌株判断为“耐药”。2015 年，美国 CDC 和欧洲 CDC 分别报道临床分离株对头孢曲松的非敏感率分别为 0.3%和 0.1%。对头孢克肟，非敏感率分别为 0.5%和 1.7%。然而，环丙沙星和阿奇霉素的折点差异太大，无法直接进行比较。2015 年，在 CDC 研究中环丙沙星耐药率为 22.3%（MIC≥1.0 mg/L），而 ECDC 的耐药率为 49.4%（MIC>0.06 mg/L）。在美国，阿奇霉素“敏感性降低”（MIC≥2.0 mg/L）为 2.6%，而在欧洲，“耐药”（MIC>0.5 mg/L）为 7.1%。对头孢菌素的不敏感性在 2011 年后又开始下降[16,144]，但一些指南继续推荐将肌内注射头孢曲松和口服阿奇霉素联合用药作为一线治疗方案[145-146]。在不能选择头孢曲松的情况下，可用头孢克肟来代替。氟喹诺酮类药物只有通过药敏试验结果显示敏感时才可用于治疗。

（二）脑膜炎奈瑟菌（*N. meningitidis*）

脑膜炎奈瑟菌药敏试验需要对该菌进行培养。然而，CLSI 和 EUCAST 推荐的方法不同，CLSI 建议使用含 5%绵羊血的水解酪蛋白琼脂（Mueller-Hinton，M-H）进行纸片扩散法试验，或使用经阳离子调整含溶解马血的 M-H 肉汤进行微量肉汤稀释法。EUCAST 仅推荐经制造商验证的 MIC 方法。与淋病奈瑟菌相比，脑膜炎奈瑟菌通常对青霉素敏感，很少产 β-内酰胺酶[147]。尽管由于青霉素结合蛋白 2 位点的改变，越来越多的国家表明其敏感性已经降低，但在许多国家，青霉素仍然被用作为 IMD 的首选治疗方案[148-149]。青霉素结合蛋白的分子基础是 5 个氨基酸多态性的组合，位于 PenA 蛋白转肽酶区域的 504、510、

515、541 和 566 位[150]。与头孢克肟耐药的淋病奈瑟菌类似[141]，头孢克肟中介的脑膜炎奈瑟菌的 *penA* 基因被发现具有镶嵌结构，表明脑膜炎奈瑟菌与寄生的奈瑟菌之间发生了多次 DNA 水平转移[150]。此外，对青霉素中介的菌株，头孢噻肟的 MIC 值较高[151]。CLSI 没有提供耐药折点，将 MIC≤0.12 mg/L 的菌株定义为敏感[138]。同样，EUCAST 将 MIC 为≤0.125 mg/L 的菌株判断为敏感[139]。虽然头孢噻肟非敏感菌株在全球是罕见的，但来自印度有 8 株非敏感菌株的报道，其 MIC 高达 8 mg/L[153]，但尚未正式证实[154]。利福平和环丙沙星可用于密切接触者的预防用药。利福平耐药是由 RNA 聚合酶 β 亚基(*rpoB*)基因点突变引起[155]。尽管只需一次突变即可引起耐药，但其耐药率还是非常低的[156]。2007 年，美国出现环丙沙星耐药菌株[157]，其与 DNA 促旋酶(DNA gyrase)A 亚基编码基因(*gyrA*)的 91 号位点突变相关。虽然在美国和欧洲耐药菌株的检出率较低[157]，但是印度一次 IMD 暴发时，据报道其耐药率惊人地高达 65%[158]。在环丙沙星耐药率较高的地区，可用阿奇霉素作为密切接触者的预防用药[157]。

十二、结果的评价、解释和报告

(一)淋病奈瑟菌(*N. gonorrhoeae*)

由于用于鉴定淋病奈瑟菌的许多检测方法的特异性不高，试验结果必须结合当地疾病流行率进行解读，流行背景对试验的阳性预测值(PPV)有较大影响。尤其是核酸扩增试验(NAAT)的解读，由于特异性不同，在低流行区不统一推荐使用[94]。如果检测结果应用于法医学，例如被性侵犯受害者样品的检测，需要对签发阳性结果的实验室操作程序进行慎重审核。

在低流行人群中，应拟定专门的方案来确保检测结果得到确认。这对于来自儿童和青少年的标本以及性虐待案件的标本检测一样重要。这些情况，应该至少用两种不同的方法进行疑似淋病奈瑟菌的确认，其中包括：①多种鉴定方法；②免疫学方法；③16S rRNA 基因测序；④MALDI-TOF MS 分析。此外，菌株和 DNA 样本都需要保存。

在高患病流行区，如为性健康服务的医学临床实验室，与鉴定正确菌种相比，鉴定结果明确为"是"还是"不是"的确证试验可能更可取。为此，实验室报告可以附加 2 个级别的确证试验。如果满足下面 2 个标准的任意一个，可做出淋病的初步诊断：①男性尿道分泌物涂片显微镜下见到典型的革兰阴性双球菌；②来自男性尿道或妇女子宫颈内膜的标本在选择性培养基上生长并显示典型的菌落形态，氧化酶阳性和典型的革兰阴性双球菌形态，提示为淋病奈瑟菌。由于脑膜炎奈瑟菌(译者注：结合上下文以及病原菌特点，此处应为淋病奈瑟菌)被认为是尿道炎的病原体[159-160]，确诊需要同时满足以下 2 条：①对来自性暴露部位(即尿道、子宫颈内膜、咽喉或直肠)的标本在选择培养基上进行培养，分离出氧化酶阳性和典型的革兰阴性双球菌。②通过生化或核酸试验确认。

(二)脑膜炎奈瑟菌(*N. meningitidis*)

从常见的无菌体液如血液或脑脊液中分离出的脑膜炎奈瑟菌通常被认为是病原菌。此外，如果细菌分离自尿道、子宫颈或结膜，也可能是致病菌。来自克隆复合群 11(所谓的 ET-15)的无荚膜脑膜炎奈瑟菌是新出现的泌尿生殖病原体[160]。在这些情况下，实验室应报告检测到脑膜炎奈瑟菌，把菌株提交到参考实验室。由于脑膜炎球菌性结膜炎直接引起侵袭性疾病的风险很高，许多国家的指南都将脑膜炎球菌性结膜炎视为需对患者和密切接触者进行药物预防的指征[161-162]。从支气管肺泡灌洗液或痰标本中检出脑膜炎奈瑟菌需要与临床医生沟通，因为它并不一定意味着具有致病作用。口咽或鼻咽标本生长脑膜炎球菌通常反映了无症状携带。通常不建议使用药物清除无症状携带菌。因为携带是一种相当普遍的现象，患侵袭性疾病的风险非常低。此外，不建议对与侵袭性疾病患者密切接触者常规进行鼻咽拭子取样检测脑膜炎奈瑟菌，因为这样可能检测出无关菌株，也耽误了密切接触者的药物预防。

(三)其他奈瑟菌

1. 动物口腔奈瑟菌(*N. animaloris*)　动物口腔奈瑟菌为革兰阴性球杆菌，可能是被犬咬伤后导致感染的不明病原菌[45]。动物口腔奈瑟菌是猫和犬口腔的寄生菌，原名 CDC 群 EF-4a。动物口腔奈瑟菌为产黄白色色素、凸起、不透明、有光泽、

光滑并在血琼脂上溶血的菌落[163]。与大多数其他奈瑟菌相比,该菌株能在麦康凯琼脂上生长。精氨酸双水解酶阳性是动物口腔奈瑟菌的鉴别特征。该菌株对氨苄西林敏感[45]。更多的特点详见表 36-2。

2. 杆状奈瑟菌(*N. bacilliformis*) 与长奈瑟菌、编织奈瑟菌和沙伊甘奈瑟菌新种类似,杆状奈瑟菌为杆状,而不是球状。在血琼脂平板上,菌落光滑,有光泽,24 h 后菌落直径可达到 1 mm[10]。菌落颜色可为淡灰色到浅黄色(图 36-2)。触酶和硝酸盐还原不定,不发酵糖[10]。与人呼吸道感染有关,偶尔可为心内膜炎的病原体[10,164]。

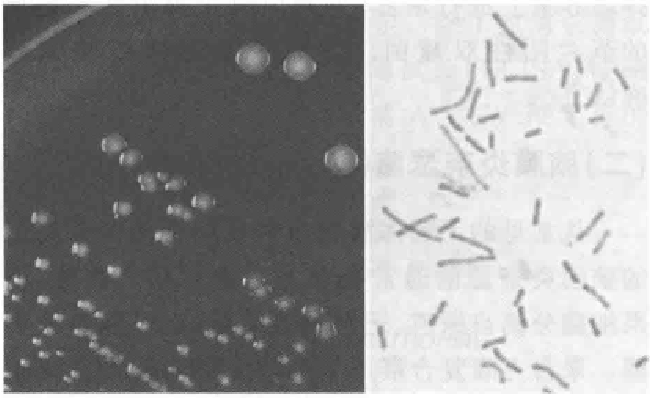


图 36-2 杆状奈瑟菌培养菌落形态(左)和革兰染色(右)[10]

注:菌株分离自人牙周袋。通过 16S rRNA 近全基因测序鉴定。需要注意的是该菌形态为杆状,见彩插

3. 灰色奈瑟菌(*N. cinerea*) 顾名思义,灰色奈瑟菌菌落为浅灰色,菌落直径为 1.5 mm。不分解糖,即在碳水化合物培养基中不产酸。根据碳水化合物利用特征,灰色奈瑟菌易与葡萄糖阴性的淋病奈瑟菌相混淆[110]。此外,尽管灰色奈瑟菌对多黏菌素敏感,但偶尔也会在选择性培养基上生长[165]。超过 24%的成年人口咽部有灰色奈瑟菌定植。其可能是引起婴幼儿眼部感染的原因之一[167]。最近发表了 1 例在三叉神经节后滴注甘油后发生脑膜炎的病例[124]。

4. 长奈瑟菌(*N. elongata*) 长奈瑟菌为灰白色、半透明菌落,孵育 48 h 后直径可达 3 mm。与奈瑟菌属中大部分菌种相比,长奈瑟菌为直径约 0.5 μm 的短杆菌。该菌种包括 3 个亚种:长奈瑟菌长亚种(*N. elongata* subsp. *elongata*)、长奈瑟菌糖酵解亚种(*N. elongata* subsp. *glycolytica*)和长奈瑟菌硝酸盐还原亚种(*N. elongata* subsp. *nitroreducens*)(表 36-2)。与其他奈瑟菌属细菌不同,长奈瑟菌硝酸盐还原亚种触酶为阴性。像其他奈瑟菌种一样,长奈瑟菌为人口咽部的主要定植菌。尽管如此,仍有几例由长奈瑟菌引起的心内膜炎的报道[168]。

5. 浅黄奈瑟菌(*N. flavescens*) 浅黄奈瑟菌为光滑、不透明的黄色菌落。浅黄奈瑟菌不分解糖类产酸,但能利用蔗糖产淀粉样多糖,可通过对在含蔗糖的脑心浸出液琼脂上生长的菌落加入含碘溶液(如复方碘溶液)进行检测。如果菌落变为深蓝色,则碘试验为阳性,证明存在淀粉样多糖。浅黄奈瑟菌定植于人咽部,很少引起疾病,如感染性心内膜炎[169]。最近的基因组分析表明,浅黄奈瑟菌应重新归为微黄奈瑟菌的一个变种[13]。

6. 乳糖奈瑟菌(*N. lactamica*) 乳糖奈瑟菌容易与脑膜炎奈瑟菌相混淆,因为其与脑膜炎奈瑟菌的形态相似,且可以在选择性培养基上生长。然而,除了葡萄糖和麦芽糖外,乳糖奈瑟菌可分解乳糖产酸,γ-谷氨酰氨肽酶呈阴性。乳糖奈瑟菌是婴幼儿和儿童上呼吸道的定植菌。与脑膜炎奈瑟菌相比,乳糖奈瑟菌的口咽定植始于出生后 2 周[170]。虽然有报道引起脑膜炎和菌血症的特殊病例,但乳糖奈瑟菌很少致病。乳糖奈瑟菌通常对青霉素敏感性低。

7. 黏膜奈瑟菌(*N. mucosa*) 黏膜奈瑟菌通常为大、黏着、黏液状的菌落,大多不产色素。碳水化合物利用试验,葡萄糖、麦芽糖、果糖和蔗糖分解试验均为阳性。黏膜奈瑟菌通常是人鼻咽部的非致病寄生菌。然而,它可引起感染性心内膜炎[171]和中性粒细胞减少患者的菌血症[172]。由于其青霉素的敏感性不定,所以治疗必须依据细菌药物敏感试验的结果。

8. 口腔奈瑟菌(*N. oralis*) 最近报道的口腔奈瑟菌在遗传学上与黏膜奈瑟菌海德堡变种难以区分[15]。口腔奈瑟菌为小、圆形、潮湿、黄色和弱溶血的菌落[14]。可在含有葡萄糖、麦芽糖和蔗糖的培养基上产酸。能将硝酸盐还原为亚硝酸盐。类似于脑膜炎奈瑟菌,表现出 γ-谷氨酰转移酶活性;类似于淋病奈瑟菌,脯氨酸亚氨肽酶为阳性。一些分离菌株还表现出 β-半乳糖苷酶活性,直到最近,人们一直认为 β-半乳糖苷酶是乳糖奈瑟菌的特异性酶。口腔奈瑟菌是从健康牙龈下的牙菌

斑中分离出来的，被认为是口咽寄生菌。偶尔从血液中分离出口腔奈瑟菌，是否意味着其具有潜在的致病性尚待研究。

9. 多糖奈瑟菌(*N. polysaccharea*)　多糖奈瑟菌菌株表现为小、黄灰色、半透明的菌落。类似于脑膜炎奈瑟菌，能分解葡萄糖及麦芽糖产酸，而不能分解果糖和乳糖产酸。此外，它们能在选择性培养基上生长。然而，与脑膜炎奈瑟菌相反，其碘试验为阳性，表明可分解蔗糖产淀粉样多糖(类似于浅黄奈瑟菌)。该菌定植于儿童鼻咽部，迄今与疾病无关。

10. 干燥奈瑟菌(*N. sicca*)　干燥奈瑟菌为菌落大(≤3 mm)、干燥、皱褶、灰白色的菌落，但有些菌株可产生黄色素。其碳水化合物利用试验结果与黏膜奈瑟菌没有区别，但它不还原硝酸盐。干燥奈瑟菌是人口咽部位常见的寄生菌。然而，它也会成为条件致病菌。例如，干燥奈瑟菌被认为是感染性心内膜炎的病原体[173]。最近基因组分析表明，干燥奈瑟菌及恒河猴奈瑟菌应归为黏膜奈瑟菌的变种[13]。

11. 微黄奈瑟菌(*N. subflava*)　微黄奈瑟菌为光滑、透明度不定、产黄色素的菌落。该菌包含以前的微黄奈瑟菌、深黄奈瑟菌(*N. perflava*)和黄色奈瑟菌(*N. flava*)[1]。微黄奈瑟菌菌株均可分解葡萄糖和麦芽糖产酸。此外，微黄奈瑟菌微黄生物变种(*N. subflava* biovar. *subflava*)和微黄奈瑟菌黄色生物变种(*N. subflava* biovar. *flava*)可分解果糖产酸，而微黄奈瑟菌深黄生物变种(*N. subflava* biovar. *perflava*)可分解蔗糖产酸，并可利用蔗糖产淀粉样多糖。微黄奈瑟菌是人类口咽部常见的寄生菌，但偶尔与侵袭性疾病有关，如脑膜炎、心内膜炎和菌血症[174]。与乳糖奈瑟菌相似，微黄奈瑟菌对青霉素敏感性降低，也有报道对头孢克肟和环丙沙星的敏感性也降低[175]。

12. 编织奈瑟菌(*N. weaveri*)　编织奈瑟菌菌落大小不等(1～2 mm)，光滑，平坦略有光泽[1]，菌落边缘整齐，为灰色。如同多数奈瑟菌属的菌种一样，编织奈瑟菌触酶和氧化酶强阳性。与杆状奈瑟菌、长奈瑟菌一样，编织奈瑟菌为杆状，而不是球状。编织奈瑟菌不分解碳水化合物，也不还原硝酸盐[176]。菌株偶尔从被犬咬的伤口和犬的口腔中分离出[176]。虽然有免疫抑制患者菌血症报道，但其导致的侵入性疾病非常罕见[152]。

13. 动物咬伤奈瑟菌(*N. zoodegmatis*)　类似于动物奈瑟菌，动物咬伤奈瑟菌为革兰阴性球杆菌[43]，以前CDC曾命名为EF-4b群。其宿主[43]、菌落形态、在麦康凯琼脂上生长[163]以及临床意义[45]与动物奈瑟菌相同。然而，与动物奈瑟菌不同，动物咬伤奈瑟菌精氨酸双水解酶为阴性[163]。

十三、结语

脑膜炎奈瑟菌和淋病奈瑟菌是奈瑟菌属的主要病原菌。其余奈瑟菌大多为寄生菌，很少引起疾病。虽然脑膜炎奈瑟菌和淋病奈瑟菌均可引起尿道炎，但其引起的疾病在受累器官、传播途径和病死率方面有所不同。此外，抗生素耐药是淋病的主要问题，必须联合使用抗生素进行经验性治疗。由于致病菌的培养可能受到培养条件较大影响，故分子生物学方法对脑膜炎球菌病和淋病的诊断具有重要意义。新型液态Amies运送培养基有助于培养技术的广泛应用，因为它能促进冷藏后细菌的生长。

参考文献请扫二维码查阅

第37章　凝聚杆菌属、二氧化碳噬纤维菌属、艾肯菌属、金氏菌属、巴斯德菌属和其他苛养菌或少见革兰阴性杆菌

REINHARD ZBINDEN

（张嵘　译；单斌、汤一苇　审校）

本章所涉及的不同菌属在分类学上属于心杆菌科（*Cardiobacteriaceae*）、黄杆菌科（*Flavobacteriaceae*）、纤毛菌科（*Leptotrichiaceae*）、奈瑟菌科（*Neisseriaceae*）、巴斯德菌科（*Pasteurellaceae*）和紫单胞菌科（*Porphyromonadaceae*），但它们共同的特点将会放在同一组中进行讨论。除色杆菌属（*Chromobacterium*）和巴斯德菌属某些菌种（*Pasteurella* spp.）的某些菌种外，其他需氧菌需要在含有添加剂的培养基中生长，它们通常生长缓慢（35～37 ℃，48 h）；不能在麦康凯培养基和伊红-亚甲蓝培养基上生长。初次分离培养需要在5%～10%的 CO_2 环境下进行，传代培养后 CO_2 可促进其生长。除色杆菌外，其他细菌没有鞭毛但可以表现为"滑动"或"蹭动"，使菌落呈扩散生长，并且引起琼脂表面凹陷。

这些细菌难以用常规的表型方法进行鉴定。商业化的鉴定系统[1-4]只能鉴定从人体标本中分离到的常见细菌，包括引起感染性心内膜炎HACEK群细菌[嗜血杆菌属某些菌种（*Haemophilus* spp.）、凝聚杆菌属某些菌种（*Aggregatibacter* spp.）、心杆菌属某些菌种（*Cardiobacterium* spp.）、啮蚀艾肯菌（*Eikenella corrodens*）和金氏菌属某些菌种（*Kingella* spp.）][5]。如果需要准确鉴定这类少见菌，需要采用分子生物学方法（如16S rRNA基因分析）[6]。应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）进行鉴定亦非常有前景[7-8]。分子生物学方法和MALDI-TOF MS都将在这一节进行讨论。细菌脂肪酸检测已不再作为临床常规项目；这部分内容参见本手册第10版的第33章。本章仅讨论可以从人体中分离的菌种。

一、分类

巴斯德菌科（*Pasteurellaceae*）的分类发生了重要变化[9]（http://www.the-icsp.org/taxonomic-subcommittees）；该科包含25个属，90多个种，其中放线杆菌属（*Actinobacillus*）、凝聚杆菌属、嗜血杆菌属和巴斯德菌属4种菌是人类致病菌。巴斯德菌科的属、种及亚种的分类标准已经被提出并可能会有进一步的变化，Bisgaard 16分类群的细菌已被归属为居犬弗雷德里克森菌（*Frederiksenia canicola*）新属、新种，这部分不在本章中叙述[10]。凝聚杆菌属原名为嗜血杆菌属[11]也包括在本章中；嗜血杆菌属在第38章中陈述。形状为杆状的奈瑟菌属细菌某些菌种（*Neisseria* spp.），如长奈瑟菌解糖亚种（*Neisseria elongate* subsp. *glycolytica*）、长奈瑟菌硝酸盐还原亚种（*Neisseria elongate* subsp. *nitroreducens*）、编织奈瑟菌（*Neisseria weaveri*）和动物口腔奈瑟菌（*Neisseria animaloris*）[12]见第36章，关于其鉴定见表37-4。

1. 放线杆菌属（*Actinobacillus*）　巴斯德菌科中的放线杆菌属是一类兼性厌氧、无动力、革兰阴性杆菌，包括感染动物的放线杆菌[马驹放线杆菌（*A. equuli*）、李氏放线杆菌（*A. lignieresii*）、胸膜肺炎放线杆菌（*A. pleuropneumoniae*）和猪放线杆菌（*A. suis*）]和仅感染人的放线杆菌[人放

线杆菌（*A. hominis*）和脲放线杆菌（*A. ureae*）］菌种，但不再包括伴放线放线杆菌（*A. actinomycetemcomitans*）[11]。放线杆菌属 DNA 的 G+C 含量为 40～43 mol%[13]。

2. 凝聚杆菌属（*Aggregatibacter*） 多位点序列分析表明，伴放线放线杆菌、嗜沫嗜血杆菌（*H. aphrophilus*）、副嗜沫嗜血杆菌（*H. paraphrophilus*）和惰性嗜血杆菌（*H. segnis*）[11]是同一个单系类群。嗜沫嗜血杆菌和副嗜沫嗜血杆菌间的 DNA 的同源性为 77%，嗜沫嗜血杆菌的 DNA 可将副嗜沫嗜血杆菌转化为 NAD 非依赖性[11]。因此，提议将伴放线放线杆菌、嗜沫嗜血杆菌、副嗜沫嗜血杆菌和惰性嗜血杆菌组成一个新的属，归属于巴斯德菌科的凝聚杆菌属，将原先的嗜沫嗜血杆菌和副嗜沫嗜血杆菌合并为嗜沫凝聚杆菌（*A. aphrophilus*），包括依赖和不依赖 V 因子的菌株[11]。凝聚杆菌属 DNA 的 G+C 含量介于 42～44 mol%[13]。

3. 二氧化碳嗜纤维菌属（*Capnocytophaga*） 二氧化碳嗜纤维菌属隶属于黄杆菌科，目前包括 9 个种：狗咬二氧化碳嗜纤维菌（*C. canimorsus*）、犬咬二氧化碳嗜纤维菌（*C. cynodegmi*）、黄褐二氧化碳嗜纤维菌（*C. ochracea*）、牙龈二氧化碳嗜纤维菌（*C. gingivalis*）、生痰二氧化碳嗜纤维菌（*C. sputigena*）、溶血二氧化碳嗜纤维菌（*C. haemolytica*）、颗粒二氧化碳嗜纤维菌（*C. granulosa*）、利德贝特二氧化碳嗜纤维菌（*C. leadbetteri*）和 AHN8471 基因型，均为兼性厌氧、无动力的革兰阴性杆菌，但具有"滑行"运动能力[14]。提议犬二氧化碳嗜纤维菌（*C. canis*）和口炎二氧化碳嗜纤维菌（*C. stomatis*）作为以狗和猫为宿主的新菌种[15,16]。二氧化碳嗜纤维菌属 DNA 的 G+C 含量为 34～44 mol%[17]。

4. 心杆菌属（*Cardiobacterium*） 心杆菌属隶属于心杆菌科，为兼性厌氧、无动力的革兰阴性杆菌，包括人心杆菌（*C. hominis*）和瓣膜心杆菌（*C. valvarum*）[18]。心杆菌属 DNA 的 G+C 含量介于 59～60 mol%[19]。

5. 色杆菌属（*Chromobacterium*） 色杆菌属隶属于奈瑟菌科，兼性厌氧，有动力。包括多个菌种，其中紫色色杆菌（*C. violaceum*）和溶血色杆菌（*C. haemolyticum*）是能引起人类疾病的菌种[20-21]。其 DNA 的 G+C 含量介于 65～68 mol%[20]。

6. 营发酵单胞菌属（*Dysgonomonas*） 营发酵单胞菌属隶属于紫单胞菌科，为兼性厌氧、无动力的革兰阴性杆菌[22]。目前从人体分离的有 4 个菌种：类二氧化碳嗜纤维营发酵单胞菌（*D. capnocytophagoides*）、嘉德营发酵单胞菌（*D. gadei*）[23]、莫氏营发酵单胞菌（*D. mossii*）[24]和霍夫斯塔德营发酵单胞菌（*D. hofstadii*）[25]。其 DNA 的 G+C 含量约 38 mol%[22]。

7. 艾肯菌属（*Eikenella*） 艾肯菌属隶属于奈瑟菌科，为兼性厌氧、无动力的革兰阴性杆菌[20]，迄今为止只有一个种，即啮蚀艾肯菌（*E. corrodens*）。其 DNA 的 G+C 含量介于 56～58 mol%[20]。

8. 金氏菌属（*Kingella*） 金氏菌属隶属于奈瑟菌科，兼性厌氧，无动力，包括金氏金氏菌（*K. kingae*）、反硝化金氏菌（*K. denitrificans*）、口腔金氏菌（*K. oralis*）和蜜熊金氏菌（*K. potus*）[20,26]。其 DNA 的 G+C 含量介于 47～58 mol%[20]。

9. 巴斯德菌属（*Pasteurella*） 巴斯德菌科的巴斯德菌属的分类在一段时间经常改变[13]（http://www.bacterio.net）。多杀巴斯德菌（*P. multocida*）包括以下 3 个亚种：多杀亚种（*multocida*）、败血症亚种（*septica*）和杀禽亚种（*gallicida*）。而犬巴斯德菌（*P. canis*）、咬伤巴斯德菌（*P. dagmatis*）、口腔巴斯德菌（*P. oralis*）和口巴斯德菌（*P. stomatis*）属于分离自人体的其他巴斯德菌种。其 DNA 的 G+C 含量介于 38～46 mol%[13]。对于下面讨论的以"*P.*"或"*Pasteurella*"开头的菌种，可能需要分成新的菌属或重新分类[28]。

10. 西蒙斯菌属（*Simonsiella*） 西蒙斯菌属隶属于奈瑟菌科，专性需氧，有动力，可呈"滑行"运动[20]。米氏西蒙斯菌（*S. muelleri*）是唯一从人类分离的西蒙斯菌种。西蒙斯菌属 DNA 的 G+C 含量介于 40～50 mol%[20]。

11. 链杆菌属（*Streptobacillus*） 链杆菌属隶属于纤毛菌科[27]，为兼性厌氧、无动力的革兰阴性杆菌。念珠状链杆菌（*S. moniliformis*）和香港链杆菌（*S. hongkongensis*）是分离自人体的链杆菌，其 DNA 的 G+C 含量介于 25.7～28.9 mol%[29]。见第 56 章纤毛菌科的纤毛菌属（*Lep-*

totrichia)。

12. 萨顿菌属(*Suttonella*) 萨顿菌属隶属于心杆菌科[19]，为兼性厌氧、无动力的革兰阴性杆菌。迄今为止，仅包含一种从人类分离出的菌种，产吲哚萨顿菌(*S. indologenes*)[以前称为产吲哚金氏菌(*Kingella indologenes*)](http://www.bacterio.net)。其DNA的G+C含量为49 mol%[19]。

二、流行病学和传播

这一组中的大多数细菌是人和(或)动物口腔和(或)鼻咽部的非致病性微生物，只有色杆菌属存在于周围环境中。动物引起的传播主要是通过直接接触(如咬伤或舔皮肤伤口，如狗咬二氧化碳噬纤维菌[30]和巴斯德菌属[31])，人类之间主要通过飞沫传播(如金氏菌属直接通过飞沫传播[26]，啮蚀艾肯菌通过随身用具或人之间咬伤而传播[32])。它们可能引起人体内任何部位的感染。某些类型的败血症存在一定的感染风险因素(如肝硬化患者易感染多杀巴斯德菌[33]，中性粒细胞减少患者可能会感染氧化酶阴性的二氧化碳噬纤维菌[34]。内源性感染同样存在，如HACEK群细菌引起的心内膜炎。一项大型多国家队列研究显示，HACEK群细菌引起的感染性心内膜炎占所有心内膜炎的1.4%，其特征有初次症状出现与确认诊断的间隔时间较长(2周至6个月)，左心的自身或人工瓣膜上有大量赘生物，经常发生栓塞。适当的抗生素治疗可以得到良好的预后[5]。

嗜血杆菌属和凝聚杆菌属主要寄居于人类口腔，包括牙菌斑中[11]。心杆菌属细菌常寄居在人类口腔、鼻咽部，也可寄居在胃肠道和泌尿生殖道[19]。啮蚀艾肯菌常寄居在人类或哺乳动物类的口腔，也可寄居于胃肠道，可通过唾液(咬伤、注射器)传播感染[32]，但其主要引起内源性感染。金氏菌属细菌主要寄居在人类的上呼吸道和口腔黏膜，也可寄居在灵长类的上呼吸道和口腔黏膜。金氏金氏菌常定植于6个月至4岁儿童的喉部而非鼻咽部[26]。金氏金氏菌可通过呼吸道飞沫传播引起疾病暴发流行[35-36]。尽管大多数金氏金氏菌为内源性感染，金氏金氏菌的口咽部定植率与侵袭性骨关节感染在不同季节组和年龄组人群中的发病率无关[36]。口腔金氏菌分离自人的口腔[20]。产吲哚萨顿菌不是HACEK群细菌的成员，但可引起心内膜炎[37]，但是它的自然寄居地迄今未知[19]。

李氏放线杆菌(主要寄居在羊和牛的口腔)、马驹放线杆菌(寄居于马和猪的口腔)和猪放线杆菌(寄居于猪的口腔)可通过与动物接触而传播给人类[38]。人放线杆菌和脲放线杆菌仅寄生于人类，通常的寄居部位未知[38-39]。

氧化酶和触酶阴性的黄褐二氧化碳噬纤维菌、牙龈二氧化碳噬纤维菌、生痰二氧化碳噬纤维菌、溶血二氧化碳噬纤维菌、颗粒二氧化碳噬纤维菌及最近发现的利德贝特二氧化碳噬纤维菌和AHN8471基因型是人类口腔内的正常菌群但不是主要菌群[14]。前3种菌分离自成人牙周病患者，但也能在非牙周病患者中分离到；其他4种分离自儿童及成人上、下牙龈的菌斑[14]，多引起内源性感染。氧化酶和触酶阳性的狗咬二氧化碳噬纤维菌和犬咬二氧化碳噬纤维菌寄居于健康狗和猫的口腔中，其中通过培养法，25%的狗口腔可检出狗咬二氧化碳噬纤维菌，如采用PCR方法，检出率高达85%～100%；而在猫口腔中通过培养，该菌的检出率为15%[40]。

紫色色杆菌寄居于北纬35°到南纬35°之间(南非国家、东南亚国家、澳大利亚、美国东南部，少见于美国南部)的热带和亚热带气候的土壤和水环境中[41]。主要通过皮肤入侵，也有通过口腔摄入感染的报道[41]。溶血色杆菌通常寄居于热带和亚热带气候的河流湖泊中，可寄居在温带地区的河流湖泊中[42]。

大多数类二氧化碳噬纤维营发酵单胞菌分离自免疫功能不全患者的大便标本，小部分分离自其他类型的标本[43]。类二氧化碳噬纤维营发酵单胞菌和其他营发酵单胞菌属细菌的寄居部位尚不清楚[24-25]。

巴斯德菌属细菌广泛分布于健康或患病的野生或家养的动物中，包括啮齿类动物、狗和猫，常寄居于鼻咽部和牙龈[13]。人类感染巴斯德菌主要是通过与动物接触(咬、舔或抓伤)。相关菌种中，产气巴斯德菌(*P. aerogenes*)主要分离自猪[31]，马巴斯德菌(*P. caballi*)分离自猪和马[31,44]，侵肺巴斯德菌(*P. pneumotropica*)分离自啮齿类和狗[27]，贝蒂巴斯德菌(*P. bettyae*)的寄居部位尚不清楚。侵肺巴斯德菌重新分类为侵肺啮齿杆菌

(*Rodentibacter pneumotropicus* comb. nov.)[28]。

米氏西蒙斯菌主要寄居于人类的口腔中。健康人群中西蒙斯菌属细菌的分离率达 30%～40%,儿童的分离率可能更高。在狗和猫中,西蒙斯菌属细菌非常常见[20]。

念珠状链杆菌几乎 100% 存在于野生或实验室养的鼠和其他啮齿类动物(小鼠、沙鼠、松鼠、雪貂和鼬鼠)的上呼吸道中,偶见于以啮齿类动物为食的狗和猫中。人类主要通过被上述动物咬伤(鼠咬热)或食用被污染的食物或水(流行性关节红斑)感染[45]。香港链杆菌寄居于人的口咽部[29]。

三、临床意义

1. 放线杆菌属细菌(*Actinobacillus* spp.) 李氏放线杆菌可导致放线杆菌病,是发生于牛和羊的类似放线菌病的肉芽肿,病变组织中可见硫黄样颗粒[46]。已有关于人类被牛和羊咬伤或其他方式接触引起软组织感染的报道[31]。马驹放线杆菌和猪放线杆菌可导致马和猪的各种疾病,人类主要是通过与马和猪咬伤或密切接触而感染[31],如有一名儿童在参观农场后患脑膜炎的案例[47]。脲放线杆菌常存在于人的呼吸道,尤其是存在下呼吸道疾病的患者[13],也可作为外伤或手术后脑膜炎[48]及其他免疫功能不全患者感染的病原体[49]。人放线杆菌也有从上述这些患者中分离到的报道,偶尔也可共生存在[39]。毒力因子属于 RTX 毒素(repeats in toxin,RTX)家族的成孔蛋白毒素。RTX 毒素在结构毒素肽中有重复序列,具有细胞毒性和溶血活性。RTX 毒素在放线杆菌属和巴斯德菌科的菌种中广泛存在[50]。

2. 凝聚杆菌属细菌(*Aggregatibacter* spp.) 伴放线凝聚杆菌(*A. actinomycetemcomitans*)是青少年及成人牙周炎的主要病因之一[51-52],并可能与放线杆菌属细菌同时出现在放线菌的硫黄样颗粒中[11],还可引起 HACEK 心内膜炎[5]、骨髓炎、关节炎、软组织感染及其他感染[52]。RTX 白细胞毒素也是该菌携带的主要毒力因子之一[50]。

嗜沫凝聚杆菌可能引起全身性疾病,特别是骨和关节感染、椎间盘炎、脑脓肿、腹膜炎和心内膜炎[5,11,53-54]。惰性凝聚杆菌(*A. segnis*)引起的感染常因临床误诊而被低估,该菌可导致心内膜炎[5,55],是菌血症及其他感染的一个重要原因[53]。

3. 二氧化碳噬纤维菌属细菌(*Capnocytophaga* spp.) 黄褐二氧化碳噬纤维菌、牙龈二氧化碳噬纤维菌、生痰二氧化碳噬纤维菌、溶血二氧化碳噬纤维菌和颗粒二氧化碳噬纤维菌已经被报道是引起败血症及其他内源性感染(心内膜炎、子宫内膜炎、骨髓炎、软组织感染、腹膜炎、眼部病变和坏疽性口炎)的病原体[53,56-58]。该类菌与牙周炎的关系尚不清楚[14]。

狗咬二氧化碳噬纤维菌和犬咬二氧化碳噬纤维菌引起的感染主要与狗、猫接触或被咬伤有关。狗咬二氧化碳噬纤维菌感染患者主要表现为败血症,这些患者通常是脾切除者或酗酒者。暴发性病例预后不良,可发生弥散性血管内凝血、急性肾衰竭、呼吸窘迫综合征和休克[30]。溶血性尿毒症综合征和血栓性血小板减少性紫癜是可能的后遗症[30]。脑膜炎、角膜炎和心内膜炎等后遗症也有报道[30]。犬咬二氧化碳噬纤维菌很少分离到,主要分离自局部或全身感染[59]。犬咬二氧化碳噬纤维菌可抵抗巨噬细胞的吞噬作用及补体及白细胞的杀伤作用,犬咬二氧化碳噬纤维菌使巨噬细胞不能产生炎性细胞因子[60]。

4. 心杆菌属细菌(*Cardiobacterium* spp.) 2 种心杆菌属细菌引起的疾病主要为 HACEK 心内膜炎[5,18]。少数情况下,人心杆菌也可在其他部位分离到[56,61]。大多数已报道的瓣膜心杆菌引起的心内膜炎是牙源性的,与牙周病相关[62]。

5. 紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*) 局部感染通常由伤口污染引起,可继发伴有多器官脓肿的败血症。这些感染与中性粒细胞功能障碍(葡糖-6-磷酸脱氢酶缺乏症、慢性肉芽肿病)显著相关。非感染儿童及菌血症儿童表现出高病死率[41]。在该菌中除内毒素外,其他多种毒力因子(如黏附素、侵袭素和溶细胞蛋白)已有报道[63]。溶血色杆菌可在创伤和接触水后引起菌血症[42]。

6. 营发酵单胞菌属细菌(*Dysgonomonas* spp.) 类二氧化碳噬纤维营发酵单胞菌与人类疾病有关,主要是慢性腹泻;在对粪便样本的系统研究中,类二氧化碳噬纤维营发酵单胞菌的分离率为 1.1%～2.3%,但只有不到一半的粪便样本被认为是引起腹泻的原因[64]。菌血症也常有发生[43,65]。莫氏营发酵单胞菌分离自 1 例胰腺癌的

患者的肠液中[66]，嘉德营发酵单胞菌可分离自人类的胆囊[23]和血液[67]中，霍夫斯塔德营发酵单胞菌分离自创口[25]。

7. 啮蚀艾肯菌(*Eikenella corrodens*) 啮蚀艾肯菌与青少年和成人牙周炎有关[51]，但也可引起上呼吸道、胸膜和肺、腹部、关节、骨骼、伤口(如人咬伤)、心内膜炎的感染，偶尔可引起其他部位感染(如坏疽性口炎)[5,53,56]。这些微生物往往不致病，常与口咽部的其他微生物混合存在，尤其是葡萄球菌和链球菌。牙科操作和滥用毒品是感染的危险因素。啮蚀艾肯菌可以导致牙周组织炎症并触发一系列感染[68]。

8. 金氏菌属细菌(*Kingella* spp.) 金氏金氏菌主要引起 4 岁以下健康儿童的骨骼和关节感染[26]。细菌培养、通用 PCR 及金氏金氏菌特异性实时 PCR 显示，金氏菌属细菌是该年龄段骨关节感染的最常见病原菌[69]。脓毒性关节炎、椎间盘炎、下肢骨髓炎和隐匿性菌血症较常见。口腔炎和(或)上呼吸道感染可能先于全身性感染，提示病原菌通过受损黏膜侵入[26]。在成人中，全身性感染发生于免疫功能低下人群[26]，也可以表现为 HACEK 心内膜炎[5]。该菌的毒力因子是一种 RTX 毒素、多糖胶囊和Ⅳ型菌毛[26]。

反硝化金氏菌被报道可引起心内膜炎[5]。口腔金氏菌分离自牙周炎患者，但其与疾病的关系尚不清楚。蜜熊金氏菌已报道可引起浣熊咬伤后的伤口感染[26]。

9. 巴斯德菌属细菌(*Pasteurella* spp.) 多杀巴斯德菌主要在人类伤口及软组织感染中分离到。有时可在呼吸道定植或引起感染，有时可引起全身性感染(血源性或插管途径)，如脑膜炎、透析相关的腹膜炎、心内膜炎、内源性感染、骨髓炎、结膜炎、尿路感染和败血症，肝硬化是一个感染的危险因素[33,70-75]。多杀巴斯德菌多杀亚种是最常分离的亚种，该亚种在呼吸道感染和菌血症中比败血亚种更常见，后者常与伤口感染及中枢神经系统感染相关[31]。在呼吸道，定植可能导致鼻窦炎或支气管炎、肺炎和脓胸，肺炎和脓胸通常发生于有呼吸道基础疾病的患者[70]。毒力因子为被膜(5 种血清型，其中人类分离菌株大部分为 A 和 D 型)、脂多糖、唾液酸酶、透明质酸酶、表面黏附素、铁捕获蛋白[76]和多杀巴斯德毒素，一种高效的有丝分裂原，已被证明可阻断细胞凋亡[75]。

人类感染犬巴斯德菌(来自狗)、咬伤巴斯德菌和口腔巴斯德菌(来自狗和猫)的病例较为少见[77-78]。然而，犬巴斯德菌是从狗咬伤的伤口感染中最常分离到的细菌[31]。咬伤巴斯德菌在全身感染如肺炎、腹膜炎、败血症和心内膜炎中已有报道。此外，咬伤巴斯德菌在慢性阻塞性肺疾病的患者中可使支气管扩张症状恶化[77]。最近报道了一例来源于患者的猫的咬伤巴斯德菌样细菌引起的人工瓣膜性心内膜炎[79]。在某些巴斯德菌感染病例中，无法确定是否与动物接触[80]。由 2 种巴斯德菌属细菌引起的双重感染也有报道[77]。

在"相关"的菌种中，被猪或仓鼠咬伤可导致伤口感染产气巴斯德菌[31,81]；贝蒂巴斯德菌已在新生儿感染和男性及女性生殖道感染中分离到[82]；在被马咬伤的伤口中可分离到马巴斯德菌[31]；侵肺巴斯德菌被重新归类为侵肺啮齿杆菌(*Rodentibacter pneumotropicus*)，是一种罕见的人类全身性感染病原体[28]。以前报道的人感染鸡鸟杆菌(*Avibacterium gallinarum*)、海藻比贝尔施泰因菌(*Bibersteinia trehalosi*)、鸭鸡杆菌(*Gallibacterium anatis*)、溶血曼海姆菌(*Mannheimia haemolytica*)和葡糖苷曼海姆菌(*Mannheimia glucosida*)，它们之前都归为巴斯德菌属，并且已经报道了相关菌种[10,83-84]。

10. 西蒙斯菌属细菌(*Simonsiella* spp.) 米氏西蒙斯菌尚未发现与疾病有关。西蒙斯菌可以在上消化道、口腔黏膜和呼吸道的脱落细胞学标本中分离到，但不应该认为是真正的致病菌[85]。

11. 链杆菌属细菌(*Streptobacillus* spp.) 念珠状链杆菌感染，通常称为"鼠咬热"，是一种全身性疾病，首发症状为发热和寒战，然后是游走性有时甚至化脓性的多发性关节炎和四肢斑丘疹。罕见的并发症包括感染性心内膜炎、心肌炎或心包炎、肺炎、败血症和脓肿[29,45,86]。已从关节炎患者标本中分离出一种新特性的香港链球菌(*S. hongkongensis*)[87]。

12. 产吲哚萨顿菌(*Suttonella indologenes*) 人中分离出产吲哚萨顿菌极为少见。但曾有报道在眼部标本[53]及心内膜炎患者的血培养中分离到该菌[37]。

四、标本的采集、运输和储存

标本的采集和运输应参照本书第19章所述准则进行。许多生存力低的细菌种不论何时都需使用运送培养基进行运输，如eSwab(Copan Diagnostics Inc.,Murrieta,CA)。本章中描述的大多数细菌可以室温保存1～2周。但是一些非常特殊的苛养菌(狗咬二氧化碳噬纤维菌)需要频繁传代培养。分离菌株需在冷冻保护剂，如脱脂牛奶中，-70℃冷冻保存。

五、直接镜检

对标本或血培养阳性培养液直接涂片镜检，并结合临床信息有时可以鉴定出相应的细菌。例如，革兰染色中见到典型的梭形细菌，同时具有狗咬伤的病史，可以推断出该菌为狗咬二氧化碳噬纤维菌。在少数血培养阴性的病例中，用显微镜直接检查切除的瓣膜和(或)用全自动核酸扩增试验检测瓣膜或栓子可以诊断心内膜炎[88]。当需要判断分离的菌株是革兰阴性球菌还是球杆菌时，可以将青霉素药敏纸片贴在接种菌株的琼脂平板上。培养后取药敏纸片周围的细菌进行革兰染色，如果是典型的奈瑟菌属细菌，细菌形态为球形，否则为长杆状[89]。

放线菌属细菌是一类中等大小、革兰阴性、棒状或球形，可见两端浓染的细菌。它们通常呈单一或者成对排列，偶尔呈短链状排列。

凝聚杆菌属细菌是球杆状革兰阴性细菌，有时呈长丝状。已有基于PCR杂交的商业化检测方法，可以检测伴放线放线杆菌和其他牙周致病菌，如啮蚀艾肯菌和二氧化碳噬纤维菌属细菌[90]。

二氧化碳噬纤维菌属细菌主要形态为梭形、中等或长杆状并带有锥形端(图37-1a)。口腔纤毛菌(*L. buccalis*)是一种长梭形的革兰阴性杆菌，但是一端为锥形，一端为方形(图37-1b)。区分以上2种细菌需要通过生化反应，乳酸是口腔纤毛菌发酵终产物，而琥珀酸是噬二氧化碳菌属细菌的主要发酵终产物[53]。狗咬二氧化碳噬纤维菌也可以使用通用16S rRNA基因全自动核酸扩增试验检测[91]。

心杆菌属细菌在血平板上具有多形性。人心杆菌具有染色不规则的特点，其为直的革兰阴性杆菌，以短链状、成对或花环状排列；有时末端为球状；偶尔呈长丝状。而在巧克力平板上，这种多形性明显比在血平板上少。在少数情况下，使用通用16S rRNA基因全自动核酸扩增试验检测瓣膜和栓子有助于诊断该菌引起的感染[88]。

紫色色杆菌是一种中等大小的、革兰阴性杆菌或者球菌，具有动力，有一个极端鞭毛和1～4个横向鞭毛[20]。溶血色杆菌形成规则的革兰阴性杆菌[21]。

营发酵单胞菌属，是一类小的革兰阴性杆菌或球菌，类似于莫拉菌属细菌(*Moraxella* spp.)(图37-1c)[22]，但与奈瑟菌属细菌相反，在青霉素药敏纸片附近生长的菌落革兰染色呈长杆状[89]。

啮蚀艾肯菌是一种细长的、笔直的、小的、末端圆形的革兰阴性杆菌(图37-1d)。已有特异的商业化PCR检测试剂[90]。

金氏菌属细菌是一类短的、方形末端的革兰阴性杆菌，它们成对或者成簇排列(图37-1e)。革兰染色脱色不均匀。通用PCR可以在培养阴性的骨关节标本中检测到金氏金氏菌特异性序列[69]。

巴斯德菌属细菌是一类小的、革兰阴性杆菌或球菌，它们呈单个、成对或短链状排列，通常两极浓染。巴斯德菌属相关菌种多数呈杆状。该菌属的PCR检测技术多用于兽医领域[92]。

西蒙斯菌属细菌是一类革兰阴性、新月杆菌(长0.5～1.0 μm)，排列成多细胞聚集的丝状体[(10～50) μm×(2～8) μm]，丝状体中通常8个细菌可组成一群，排列呈毛虫样。细菌的长轴垂直于丝状体的长轴。革兰染色通常不能完全脱色[85]。

念珠状链杆菌是一种具有多形性的革兰阴性杆菌。根据菌龄和培养条件，细菌形态可以是直的、小到中等大小的杆菌，或是100～150 μm长链状，或是具有球形膨胀的长丝状(图37-1f)。在培养阴性的情况下，可以采用通用16S rRNA基因全自动核酸扩增试验[93]。

产吲哚萨顿菌是一种圆形、染色性不规则的革兰阴性杆菌，有时排列成对，链状或者是玫瑰花结状。

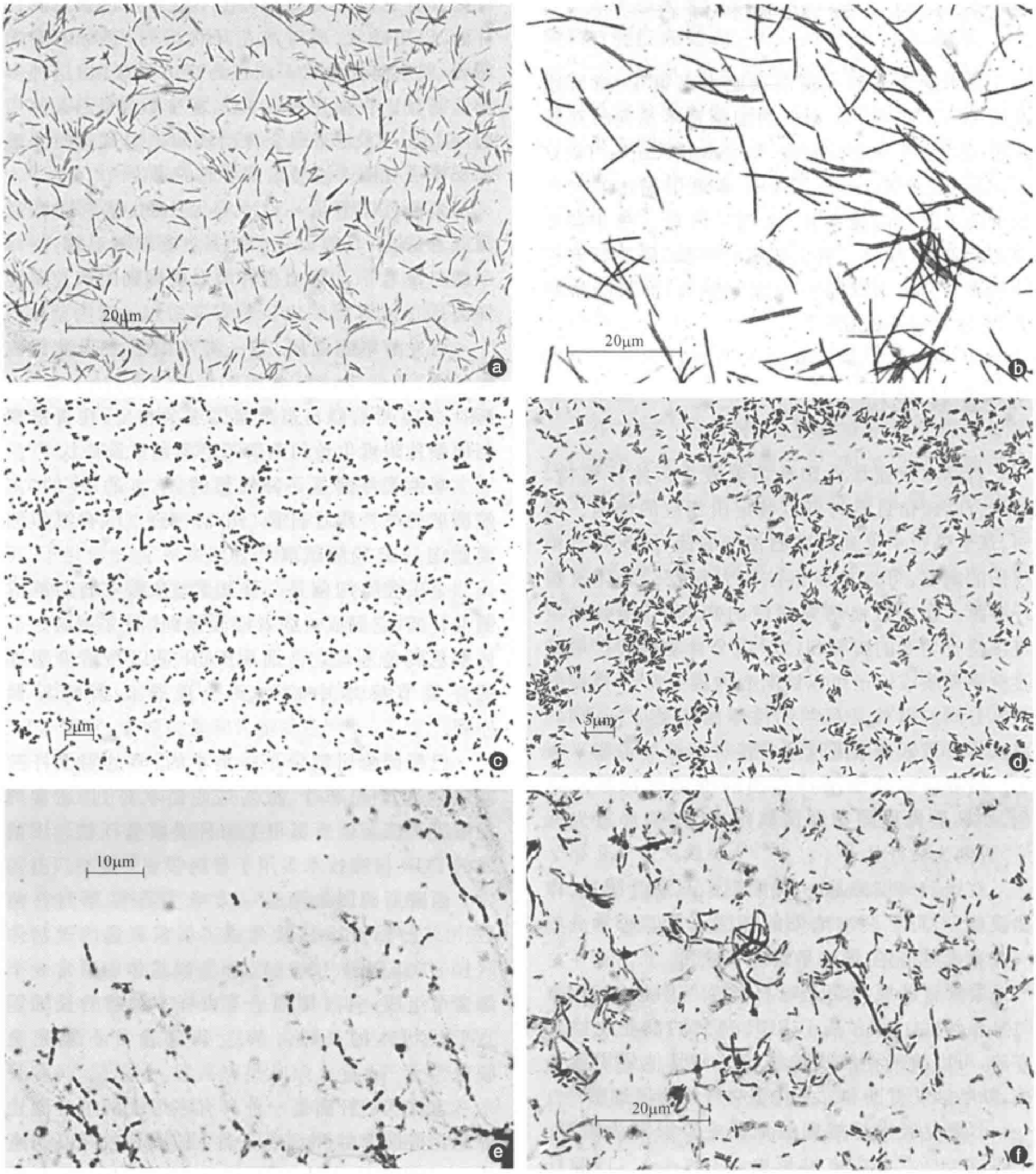


图 37-1 a. 黄褐二氧化碳噬纤维菌，在绵羊血平板上培养 48 h 后的革兰染色[苏黎世大学医学微生物学研究所，瑞士苏黎世(Institute of Medical Microbiology，University of Zurich，Zurich，Switzerland)]。b. 口腔纤毛菌，在绵羊血平板上培养 48 h 后的革兰染色(苏黎世大学医学微生物学研究所)。c. 类二氧化碳噬纤维营发酵单胞菌，在绵羊血平板上培养 48 h 后的革兰染色(苏黎世大学医学微生物学研究所)。d. 啮蚀艾肯菌。在绵羊血平板上培养 48 h 后的革兰染色(苏黎世大学医学微生物学研究所)。e. 金氏金氏菌，在胰酶消化大豆肉汤中培养 48 h 后的革兰染色(苏黎世大学医学微生物学研究所)。f. 念珠状链杆菌，在绵羊血平板上培养 48 h 后的革兰染色(苏黎世大学医学微生物学研究所)，见彩插

六、分离程序

对于此类细菌的培养，无论怀疑是正常菌群或是特定细菌感染，血平板或巧克力平板和选择性平板是必须使用的。它们大多数是兼性厌氧，在麦康凯平板上不生长。在自动血培养系统中培养，HACEK 细菌报阳时间不超过5天[94]。

放线菌属细菌和凝聚杆菌属细菌需要富养培养基，它们在含有5%～10%的CO_2环境中生长得更好。某些嗜沫凝聚杆菌（以前称为副嗜沫嗜血杆菌）和惰性凝聚杆菌菌株需要V因子，不需要氯化血红素。培养伴放线放线杆菌的选择性培养基要添加杆菌肽和万古霉素[95]。

初次分离二氧化碳噬纤维菌属细菌需5%～10%的CO_2和富养培养基；血平板的基础成分影响细菌的生长[96]。为了在混合培养物中检测此类细菌，应该使用含有杆菌肽、多黏菌素B、万古霉素和甲氧苄啶的选择性培养基[97]，如Thayer-Martin琼脂和马丁-路易斯琼脂（Martin-Lewis）[17]。狗咬二氧化碳噬纤维菌最常从血培养中分离，但常用的全自动血培养系统可能培养不出该细菌，故临床医生应该告知实验室有狗咬二氧化碳噬纤维菌感染的危险因素，以便实验室可以使用增菌培养基进行盲传培养[96]。

心杆菌属细菌在血平板上初培养时大多需要5%～10%的CO_2和一定的湿度。心杆菌属细菌多数分离自血液。

紫色色杆菌可在普通培养基上生长，即使在肠道细菌培养基上也可生长，其最佳的生长温度为30～35℃[20]。溶血色杆菌可在同一培养基上生长[21]。

营发酵单胞菌属的生长需丰富的CO_2环境，在血平板上生长缓慢[22]。其选择性培养基含有头孢哌酮、万古霉素和两性霉素B，此培养基已用于粪便培养[65]。

除了少数菌株，大部分啮蚀艾肯菌的生长除了需要5%～10%的CO_2以外，还需要氯化血红素[20]。啮蚀艾肯菌在商品化的哥伦比亚平板上生长良好[96]。

从体液和脓液标本中分离金氏金氏菌比较困难，因为此类标本中可能含有抑制物。从混合培养物中分离该菌，需要在培养基中添加克林霉素和万古霉素，推荐使用Thayer-Martin琼脂[20]。采用各种血平板培养体液标本可以显著提高检出率[26]。

与某些嗜血杆菌属细菌不同，巴斯德菌属细菌生长不需要氯化血红素和CO_2，甚至可以在不含血的培养基上生长。某些巴斯德菌属相关菌种甚至可以在肠道细菌培养基上生长[13]。

米氏西蒙斯菌可以在血平板上需氧条件下生长。尚没有分离西蒙斯菌属细菌的增菌培养方法，但已有报道可以使用不含葡萄糖琼脂的胰蛋白酶大豆肉汤进行分离[20]。

念珠状链杆菌常分离自血液、关节液或脓液标本。所用培养基需要添加绵羊血、马血或兔血（最佳比例为15%）；血清或腹水，需要在37℃，含有5%～10%的CO_2条件下培养。在血培养基中禁止使用聚茴香脑磺酸钠[45]。香港链球菌可在厌氧或含有5% CO_2有氧的哥伦比亚血琼脂平板上生长[87]。

产吲哚萨顿菌在血平板上生长缓慢。高湿度和CO_2可促进其需氧生长，这使得该菌更像是兼性厌氧菌[19]。

七、鉴定

苛养革兰阴性杆菌的表型鉴定存在许多困难。某些苛养菌属在三糖铁或是Kligler培养基上不能生长（如艾肯菌属）。培养基中应含有丰富的蛋白胨（如胱氨酸胰蛋白酶琼脂），接种量要大（细胞团或琼脂块）。未加添加剂的培养基用于检测细菌分解碳水化合物产酸可能会出现假阴性。大多数菌种分解碳水化合物产气很少或不产气。吲哚必须用二甲苯提取。另外，用于鉴定的表型特征可能有变异，也与个人的判断和专业知识有关。准确鉴定到种常需要多种常规实验室通常不使用的底物[53]，即使是自动鉴定系统中也没有[4]。但是VITEK 2 *Neisseria-Haemophilus* 鉴定卡（VITEK 2 ID-NH card, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France）可以鉴定HACEK群中的多数细菌[2,4]。巴斯德菌属细菌不包含在VITEK 2 ID-NH鉴定卡数据库中，但是它包含在革兰阴性杆菌鉴定卡的数据库中（VITEK 2 ID-GNB card; bioMérieux）[1]。对于革兰阴性菌的鉴定索引见

第35章。关键生化反应可以用于快速推测性鉴定，如API NH鉴定板条(bioMérieux)[98]。鸟氨酸脱羧酶阳性和在胱氨酸胰蛋白酶琼脂上不分解糖产酸是啮蚀艾肯菌的典型生化反应[89]；血培养分离株，吲哚阳性和触酶阴性可以鉴定为人心杆菌；分解多种糖类产酸，吲哚试验阳性是多杀巴斯德菌典型的生化反应模式，结合有被猫咬的病史，很容易得出诊断。

较新的鉴定方法如MALDI-TOF MS的应用对于HACEK群的菌种鉴定可获得比较满意的结果[7-8]。2个MALDI-TOF MS鉴定系统数据库中的菌种将在下面阐述，包括VITEK MS (bioMérieux)和Bruker MALDI Biotyper (Bruker Daltonik GmbH，Bremen，Germany)。对分离自无菌部位的苛养革兰阴性菌进行准确鉴定对患者开始适当的治疗是比较重要的。对于表型相近的菌种鉴定，分子生物学(如16S rRNA或*rpoB*基因PCR/测序)是一个比较适合的方法，它可以将放线杆菌属、凝聚杆菌属、二氧化碳噬纤维菌属和巴斯德菌属鉴定到种[6,8-9,83]。另外，分子生物学方法还可以发现与临床感染相关的新菌种。

放线杆菌属细菌37℃培养24 h后，菌落直径约为2 mm，光滑或粗糙，黏液性，通常黏附于琼脂。光滑菌落呈圆顶状，当用透射光观察时，菌落呈蓝色。放线杆菌属细菌的生化反应参见表37-1。某些放线杆菌属细菌在两个MALDI-TOF MS鉴定系统的数据库中都存在。VITEK 2 ID-NH鉴定卡的数据库中包含脲放线杆菌。

伴放线放线杆菌菌落最初呈圆点，逐渐边缘不规则，进一步培养后呈星状放射，类似“交叉的雪茄”，并嵌入琼脂。经几次传代培养后，粗糙型菌落转变为不透明、不凹陷的光滑型菌落，提示菌毛已丢失。在液体培养基中，细菌呈颗粒生长，粘贴于管壁和管底。其他凝聚杆菌属细菌菌落呈颗粒状或光滑、灰白色至微黄色，且不透明；当培养环境中无CO_2时，菌落呈多形态，大小不一。对于菌种鉴定，需要一组试验[Ⅴ和Ⅹ因子，生化反应，菌落形态(表37-1)]与嗜血杆菌属细菌区分。凝聚杆菌属细菌吲哚试验阴性，鸟氨酸脱羧酶和脲酶阴性，不依赖Ⅹ因子；嗜血杆菌属细菌在以上3个生化反应中至少有一个是阳性的，不能利用γ-氨基乙酰丙酸合成血红素成分。全自动鉴定系统很难将这些细菌鉴定到种[4,55]。惰性凝聚杆菌可通过特异的NAAT鉴定[55]。表37-1中列举的凝聚杆菌属细菌在MALDI-TOF MS鉴定系统[7-8]和VITEK 2 ID-NH鉴定卡[4]的数据库中都存在。

表37-1 放线菌属和凝聚杆菌属生化反应[a]

生化反应	李氏放线杆菌(*Actinobacillus lignieresii*)	马驹放线杆菌(*Actinobacillus equuli*)	猪放线杆菌(*Actinobacillus suis*)	脲放线杆菌(*Actinobacillus ureae*)	人放线杆菌(*Actinobacillus hominis*)	伴放线放线杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)	嗜沫凝聚杆菌(*Aggregatibacter aphrophilus*)	惰性凝聚杆菌(*Aggregatibacter segnis*)
Ⅴ因子	－	－	－	－	－	－	v	＋
β-溶血	－	v	＋	－	－	－	－	－
触酶	v	v	＋/＋[w]	＋	＋	＋	－	v
氧化酶	＋	＋	＋	＋	＋	v	v	－
水解七叶苷	－	－	＋	－	v	－	－	－
脲酶	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－
β-半乳糖苷酶试验	＋	＋	v	－	＋	－	＋	－
麦康凯生长试验	v	＋	v	－	－	－	v[w]	－
分解葡萄糖产气	－	－	－	－	－	v	＋	－
分解糖类产酸								

(续　表)

生化反应	李氏放线杆菌 (*Actinobacillus lignieresii*)	马驹放线杆菌(*Actinobacillus equuli*)	猪放线杆菌 (*Actinobacillus suis*)	脲放线杆菌 (*Actinobacillus ureae*)	人放线杆菌 (*Actinobacillus hominis*)	伴放线放线杆菌(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*)	嗜沫凝聚杆菌 (*Aggregatibacter aphrophilus*)	惰性凝聚杆菌 (*Aggregatibacter segnis*)
乳糖	v	+	+	−	+	−	$+^{D}$	−
蔗糖	+	+	+	+	+	−	+	$+^{w}$
D-木糖	+	+	+	−	+	v	−	−
麦芽糖	+	+	+	+	+	v	+	$+^{w}$
D-甘露醇	+	+	−	+	+	v	−	−
海藻糖	−	+	+	−	+	−	$+^{D}$	−
D-蜜二糖	−	+	+	−	+	−	v	−

注：[a]以上数据引自参考文献[38-39][53]和[89]。+. ≥90%的菌株为阳性；−. ≥90%的菌株为阴性；D. 迟缓反应；v. 可变的；w. 弱的；/. 或。以上所有菌种吲哚阴性，分解硝酸盐为亚硝酸盐，碱性磷酸酶阳性

经过 24 h 培养后，二氧化碳嗜纤维菌属细菌在血平板上的菌落细小；经过 2～4 天培养后，菌落直径达到 2～4 mm；呈凸起或扁平状，当从平板上刮取菌落时，呈轻微黄色，菌落呈规则的或因滑行运动边缘呈扩散生长，常黏附于琼脂表面[17]。对于氧化酶阴性的细菌由于生化反应模式相似(表 37-2)，以及在全自动鉴定系统中缺少适当的反应底物[4]导致其表型较难区分。这导致细菌经常只能被鉴定为“二氧化碳嗜纤维菌属”。

16S rRNA 基因 PCR/测序是目前最为有效的鉴定方法[6,14,99]。Bruker MALDI Biotyper 鉴定系统数据库中包含了表 37-2 中提到的所有二氧化碳嗜纤维菌属细菌[8]，VITEK MS 鉴定系统数据库中包含了部分菌种。VITEK 2 ID-NH 鉴定卡的数据库中仅能鉴定到二氧化碳嗜纤维菌属[6]。

表 37-2　二氧化碳噬纤维菌属，营发酵单胞菌属及相关菌种和链杆菌属生化反应[a]

生化反应	黄褐二氧化碳噬纤维菌(*C. ochracea*)	生痰二氧化碳噬纤维菌(*C. sputigena*)	牙龈二氧化碳噬纤维菌(*C. gingivalis*)	颗粒二氧化碳噬纤维菌(*C. granulose*)	溶血二氧化碳噬纤维菌(*C. haemolytica*)	狗咬二氧化碳噬纤维菌(*C. canimorsus*)	犬咬二氧化碳噬纤维菌(*C. cynodegmi*)	类二氧化碳噬纤维营发酵单胞菌/嘉德营发酵单胞菌(*D. canocytophagoides/D. gadei*)[b]	莫氏营发酵单胞菌(*D. mossii*)[b]	霍夫斯塔德营发酵单胞菌(*D. hofstadii*)[b]	念珠状链杆菌(*S. moniliformis*)
触酶	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−
氧化酶	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−
吲哚	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−
精氨酸双水解酶	−	−	−	ND	ND	+	+	−	−	−	+
分解硝酸盐为亚硝酸盐	v	v	−	−	+	−	v	−	−	−	−
水解七叶苷	v	+	−	−	+	v	+	v	+	+	v
明胶液化	−	v	−	−	−	−	−	−	−	−	−
β-半乳糖苷酶试验	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−

（续 表）

生化反应	黄褐二氧化碳嗜纤维菌(*C. ochracea*)	生痰二氧化碳嗜纤维菌(*C. sputigena*)	牙龈二氧化碳嗜纤维菌(*C. gingivalis*)	颗粒二氧化碳嗜纤维菌(*C. granulose*)	溶血二氧化碳嗜纤维菌(*C. haemolytica*)	狗咬二氧化碳嗜纤维菌(*C. canimorsus*)	犬咬二氧化碳嗜纤维菌(*C. cynodegmi*)	类二氧化碳嗜纤维营发酵单胞菌/嘉德营发酵单胞菌(*D. canocytophagoides/D. gadei*)[b]	莫氏营发酵单胞菌(*D. mossii*)[b]	霍夫斯塔德营发酵单胞菌(*D. hofstadii*)[b]	念珠状链杆菌(*S. moniliformis*)
分解糖类产酸											
乳糖	+	v	v	+	+	+	+	+	+	ND	−
蔗糖	+	+	+	+	+	−	+	+	+	ND	−
木糖	−	−	−	−	−	−	−	+	+	ND	−

注：[a]以上数据引自参考文献[14][23][25][53]和[89]。+. ≥90%的菌株为阳性；−. ≥90%的菌株为阴性；ND. 无数据；v. 可变的。以上所有菌种脲酶、鸟氨酸脱羧酶阴性，分解葡萄糖不产酸（有时只有添加血清后才产酸）。[b]嘉德营发酵单胞菌菌株触酶和吲哚阳性[23,67]。在 Api Rapid ID 32A 系统中，莫氏营发酵单胞菌和霍夫斯塔德营发酵单胞菌（一株）只有几个生化反应不同[25]

37℃培养 48 h 后，心杆菌属细菌在血平板上形成直径约为 1 mm 的菌落；菌落呈圆形、光滑、不透明，可能嵌入培养基。其生化反应参照表 37-3。属内的 2 个种差异很小，主要关注菌株产生吲哚反应，甘露醇发酵和细菌脂肪酸定量组成的差异[18]。一些全自动鉴定系统可能会错误地鉴定瓣膜心杆菌[98]。心杆菌属的 2 个种均包括在 Bruker MALDI Biotyper 鉴定数据库中[7-8]。VITEK 2 ID-NH 鉴定卡的数据库中仅包含人心杆菌[4]。

表 37-3　奈瑟菌属和心杆菌属一些杆状菌种的生化反应[a]

生化反应	紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)	溶血色杆菌(*Chromobacterium haemolyticum*)	啮蚀艾肯菌(*Eikenella corrodens*)	金氏金氏菌(*Kingella kingae*)	反硝反金氏菌(*Kingella denitrificans*)	口腔金氏菌(*Kingella oralis*)	蜜熊金氏菌(*Kingella potus*)	米氏西蒙斯菌(*Simonsiella muelleri*)	人心杆菌(*Cardiobacterium hominis*)	瓣膜心杆菌(*Cardiobacterium valvarum*)	产吲哚萨顿菌(*Suttonella indologenes*)
触酶	+	+[w]	−	−	−	−	−	−	−	−	v
氧化酶	v	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
吲哚	v	−	−	−	−	−	−	−	+[w]	v	+
精氨酸双水解酶	+	+	−	−	−	−	−	−	−	ND	−
分解硝酸盐为亚硝酸盐	+	+	+	−	+/G[b]	−	−	v	−	−	−
水解七叶苷	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
鸟氨酸脱羧酶	−	ND	+	−	−	−	−	−	−	ND	−
麦康凯生长试验	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
碱性磷酸酶	+	ND	−	+	−	+	−	−	−	ND	+

（续 表）

生化反应	紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)	溶血色杆菌(*Chromobacterium haemolyticum*)	啮蚀艾肯菌(*Eikenella corrodens*)	金氏金氏菌(*Kingella kingae*)	反硝化金氏菌(*Kingella denitrificans*)	口腔金氏菌(*Kingella oralis*)	蜜熊金氏菌(*Kingella potus*)	米氏西蒙斯菌(*Simonsiella muelleri*)	人心杆菌(*Cardiobacterium hominis*)	瓣膜心杆菌(*Cardiobacterium valvarum*)	产吲哚萨顿菌(*Suttonella indologenes*)
分解糖类产酸											
葡萄糖	—[c]	+[w]	—[c]	+	+	+[w]	—	+	+	v	+
蔗糖	—	ND	—	—	—	—	—	—	+	v	+
麦芽糖	—	—	—	+	—	—	—	+	+	v	+
D-甘露醇	—	+	—	—	—	—	—	—	+	v	—
特征	可能产生紫色色素	不产生色素，β-溶血	赖氨酸脱羧酶可能阳性	β-溶血	TMA琼脂生长		DNA酶阳性，产黄色素	微观形态			

注：[a] 以上数据引自参考文献[18][21][26][53][62]和[89]。+. ≥90%的菌株为阳性；—. ≥90%的菌株为阴性；G. 产气；ND. 无数据；TMA. Thayer-Martin 琼脂；v. 可变的；w. 弱的。所有以上菌种脲酶阴性，分解乳糖和 D-木糖产酸。[b] 一些菌株产生少量气体。[c] 氧化发酵培养基中为弱反应

紫色色杆菌经过 24 h 培养后，形成 1～2 mm 直径的菌落，圆形光滑，具有类似杏仁的气味，且有可能产生 β-溶血。大多数菌株产生紫色色素，因而被称为紫色杆菌素，该色素溶于乙醇，但不溶于水。尽管只有采用改良技术才能检测出氧化酶试验阳性[100]，但如果产生色素，该菌就很容易鉴定。溶血色杆菌不产生色素。2 种菌的生化反应见表 37-3。紫色色杆菌包含在 MALDI-TOF MS 鉴定系统和 VITEK 2 ID-GNB 鉴定卡的数据库中，溶血色杆菌不包含在 MS 数据库中，并且不能通过这些鉴定系统与紫色色杆菌区分[21]。

营发酵单胞菌属在培养 24 h 后菌落完整，直径为 1～2 mm，具有草莓的气味，不扩散或黏附。菌种间生化反应差异较小(表 37-2)。需氧培养口腔纤毛菌易与营发酵单胞菌属混淆；在没有条件使用 16S rRNA 基因 PCR/测序鉴定的情况下[23,25,53]，可以使用显微镜观察细菌形态，采用菌体脂肪酸含量分析，纤毛菌属分解葡萄糖后生成乳酸，营发酵单胞菌属分解葡萄糖后生成丙酸和琥珀酸[53]。在 MALDI-TOF MS 鉴定系统和 VITEK 2 鉴定卡的数据库中还未包含营发酵单胞菌属。

啮蚀艾肯菌培养 48 h 后可形成直径为 1～2 mm 的菌落，菌落中心清晰，周围呈扩散生长，可以嵌入琼脂，培养几天后菌落可呈浅黄色。在液体培养基中呈颗粒状生长。典型的分离株在无添加剂的培养基上不分解糖类产酸，且鸟氨酸脱羧酶和硝酸盐还原试验阳性；赖氨酸脱羧酶结果不定(表 37-3)。啮蚀艾肯菌在三糖铁和 Kligler 培养基上生长不佳或者根本不能生长。MALDI-TOF MS 鉴定系统和 VITEK 2 ID-NH 鉴定卡都可以很好地鉴定啮蚀艾肯菌[4,7-8]。

金氏菌属细菌在血平板上，5%～10% 的 CO_2 条件下(促进生长)培养 48 h 后，可形成 1～2 mm 直径的菌落。一类是光滑型菌落，中央凸起；另一类是扩散状菌落并且嵌入培养基中。只有金氏金氏菌在血平板上有小而明显的溶血环。该细菌存活时间较短，需要频繁传代。其生化反应参见表 37-3。除了镜下形态和菌落形态，可以借助生化反应区分金氏菌属和杆状奈瑟菌属菌种(表 37-4)，这两类细菌在自动鉴定系统中有可能混淆[4]。由于反硝化金氏菌可以在 Thayer-Martin 琼脂或马丁-路易斯琼脂上生长[20]，易被误鉴定为淋病奈瑟菌，可以用触酶试验来进行鉴别，金氏菌属触酶阴性。MALDI-TOF MS 鉴定系统和 VITEK 2 ID-NH 鉴定卡的鉴定数据库中都包含金氏菌属细菌，这 2 个鉴定系统都可以很好地鉴定金氏金氏菌[4,7-8]。

表 37-4 金氏菌属和杆状奈瑟菌属菌种的鉴别[a]

生化反应	金氏金氏菌（*Kingella kingae*）	反硝化金氏菌（*Kingella denitrificans*）	口腔金氏菌（*Kingella oralis*）	蜜熊金氏菌（*Kingella potus*）	长奈瑟菌（*Neisseria elongate*）		编织奈瑟菌（*Neisseria weaver*）	动物口腔奈瑟菌［*Neisseria animaloris*(EF-4a)］
					解糖亚种	硝酸盐还原亚种		
触酶	−	−	−	−	+	−	+	+
分解硝酸盐为亚硝酸盐	−	+	−	−	−	+	−	+
分解硝酸盐产气	−	+	−	−	−	−	−	v[b]
碱性磷酸酶	+	−	+	−	−	−	ND	−
精氨酸双水解酶	−	−	−	−	−	−	−	v[b]
β-溶血	+	−	−	−	−	−	−	−
分解糖类产酸								
葡萄糖	+	+	+[w]	−	+[w]	v		+[c]
麦芽糖	+	−	−	−	−	−	−	−

注：[a] 以上数据引自参考文献[20][26]和[53]。+. ≥90%的菌株为阳性；−. ≥90%的菌株为阴性；ND. 无数据；v. 可变的；w. 弱的。[b] 动物咬伤奈瑟菌(EF-4b)(*Neisseria zoodegmatis* EF-4b)为阴性。[c] 动物咬伤奈瑟菌(EF-4b)只有在氧化发酵培养基上才是阳性(氧化型)

巴斯德菌属细菌 37 ℃培养 24 h 后，可形成直径为 1～2 mm、不透明、浅灰色菌落。有荚膜的菌株往往表现为黏液性菌落。菌落底部为浅绿色。吲哚反应阳性的菌株可以散发出小鼠的气味。该类细菌的生化反应参见表 37-5。此类细菌的氧化酶试验应该用血平板上的菌落，在滴加氧化酶试剂 30 s 后才出现弱阳性反应是许多巴斯德菌属细菌的特点[101]。无动力、苛养生长的肠杆菌科细菌，如大肠埃希菌，有可能被错误鉴定为巴斯德菌属细菌，采用氧化酶试验可以进行鉴别。对于一些表型相近的细菌[9,27]（http://www.bacterio.net），自动鉴定系统鉴定巴斯德菌属细菌的结果并不令人满意[1,77-78]。采用 16S rRNA 和 *sodA* 基因 PCR/测序方法可以可靠地鉴定到种，*sodA* 基因 PCR/测序方法分辨力更强[83]。Bruker MALDI Biotyper 鉴定系统的数据库包含了表 37-5 中涉及的所有巴斯德菌属细菌，VITEK MS 鉴定数据库中也包含一些巴斯德菌属细菌[1,8]。VITEK 2 ID-GNB 鉴定卡的数据库中包含巴斯德菌属细菌[1]。

表 37-5 与人类有关的巴斯德菌属及其相关菌种的生化反应[a]

生化反应	多杀巴斯德菌(*P. multocida*)[b]	犬巴斯德菌(*P. canis*)	咬伤巴斯德菌(*P. dagmatis*)	口腔巴斯德菌(*P. oralis*)	口巴斯德菌(*P. stomatis*)	产气巴斯德菌[(*P.*) *aerogenes*][c]	贝蒂巴斯德菌[(*P.*) *bettyae*]	马巴斯德菌[(*P.*) *caballi*]	侵肺巴斯德菌[(*P.*) *pneumotropius*]
触酶	+	+	+	+	+	+	−	−	+
氧化酶	+	+	+	+	+	+	v	v	+
吲哚	+	+	+	+	+	−	+[w]	−	+
脲酶	−	−	+	−	−	+	−	−	+
鸟氨酸脱羧酶	+	+	−	+	−	v	−	+	+
麦康凯生长试验	−	−	−	−	−	+	v	−	v
分解葡萄糖产气	−	−	v	−	−	+	+[w]	+	−

（续 表）

生化反应	多杀巴斯德菌(*P. multocida*)[b]	犬巴斯德菌(*P. canis*)	咬伤巴斯德菌(*P. dagmatis*)	口腔巴斯德菌(*P. oralis*)	口巴斯德菌(*P. stomatis*)	产气巴斯德菌[(*P.*) *aerogenes*][c]	贝蒂巴斯德菌[(*P.*) *bettyae*]	马巴斯德菌[(*P.*) *caballi*]	侵肺巴斯德菌[(*P.*) *pneumotropius*]
分解糖类产酸									
乳糖	－	－	－	－	－	v	－	＋	－
蔗糖	＋	＋	＋	＋	＋	＋	－	＋	＋
D-木糖	v	－	－	＋	－	v	－	＋	＋
麦芽糖	－	－	－	＋	－	＋	－	＋	＋
D-甘露醇	＋	－	－	－	－	－	－	＋	－

注：[a] 以上数据引自参考文献[9][13][28][38][44]和[53]。＋.≥90%的菌株为阳性；－.≥90%的菌株为阴性；v. 可变的；w. 所有以上菌种分解硝酸盐为亚硝酸盐，精氨酸双水解酶和水解七叶苷阴性。[b] 包含多杀，败血症和杀禽 3 个亚种，山梨醇和卫矛醇发酵可以将 3 个亚种区分（＋/－多杀亚种，－/－败血症亚种，－/＋多数杀禽亚种）。对于山梨醇发酵弱阳性的多杀亚种可以通过特异性 PCR 进行鉴定[53,116]。[c] 新的菌属或重新分类的菌种需要以"(*P.*)"表示[81]

西蒙斯菌属细菌培养 24 h 后可以形成直径为 1～2 mm、滑行生长、浅黄色的菌落。米氏西蒙斯菌具有 β-溶血性。其生化反应参见表 37-3。MALDI-TOF MS 鉴定系统和 VITEK 2 鉴定卡的数据库中均不包含西蒙斯菌属细菌。

念珠状链杆菌可以在同一培养基上表现为野生型菌落和 L-型菌落。野生型菌落在血平板上培养 48～72 h 后，直径 1～3 mm，圆形，光滑。L-型菌落在透明培养基上生长良好，呈"油煎蛋"样，菌落边缘不规则，奶酪状。在液体培养中，该细菌主要以"泡沫球"的形式在管底生长。该菌在体外会迅速死亡，需要频繁传代[45]。其生化反应不活泼，葡萄糖迟缓分解弱产酸（表 37-2）。脂肪酸分析和 16S rRNA 基因测序均可鉴定此菌[53,93]。Bruker MALDI Biotyper 鉴定数据库中包含念珠状链杆菌。

产吲哚萨顿菌的菌落在血平板上呈扩散生长或嵌入琼脂生长。生化反应参见表 37-3。在两种 MALDI-TOF MS 鉴定系统的数据库中均包含产吲哚萨顿菌。

八、分型系统和血清学试验

根据表面多糖，伴放线放线杆菌可以分为 6 个血清型，其中血清型 a、b 和 c 最为多见。血清型 b 与牙周炎、心内膜炎和青霉素耐药有关；血清型 c 与牙周健康和口外感染有关[102]。

二氧化碳噬纤维菌属细菌可以通过多位点酶切电泳或限制性片段长度多态性分析进行分型[14]。随机引物 PCR 分型显示口腔中的啮蚀艾肯菌的克隆型别不稳定[103]。对于巴斯德菌属的分型可以采用 PCR 分型、限制性内切酶分析、核糖体分型、多位点序列分型和脉冲场凝胶电泳[27,104]。

对于本章中所涉及的细菌直接检测细菌抗体仅有少量的试验研究，尚未体现其应用价值。

九、抗菌药物敏感性试验

美国临床实验室标准协会（CLSI）已经颁发了 HACEK 群细菌的微量肉汤稀释法，巴斯德菌属抗生素敏感性试验（稀释法和纸片法）的指南[105]（第 74 章）。文件中明确规定 HACEK 群细菌需要检测 β-内酰胺酶，产 β-内酰胺酶菌株对氨苄西林耐药；一些菌株对氨苄西林耐药可能是由于其他耐药机制而并非产 β-内酰胺酶；对于 HACEK 群细菌，文件推荐常规检测 β-内酰胺酶[123]。欧洲抗菌药物敏感试验委员会（EUCAST）最近发布了金氏金氏菌和多杀巴斯德菌的抗生素敏感性试验稀释法和纸片法的折点；对于所有其他菌种，EUCAST 也定义了非菌种相关的药物动力学/药效折点[106]。

现已知的几种与人类疾病相关的放线杆菌属细菌的抗生素敏感性研究显示，其对包括青霉素在内的许多抗生素敏感[39,49]。

凝聚杆菌属细菌对头孢菌素类、四环素和氨基糖苷类抗生素敏感[5,107]。对氨苄西林的耐药并不罕见，但是阿莫西林/β-内酰胺酶抑制剂的复合

制剂是有效的[107]。

二氧化碳噬纤维菌属细菌通常对广谱头孢菌素类、碳青霉烯类、克林霉素、大环内酯类、四环素和氟喹诺酮类抗菌药物敏感，但是对氨基糖苷类耐药[58]。人类口腔中的二氧化碳噬纤维菌属细菌对大环内酯类耐药很常见[108]，有时可检出多重耐药菌株[57,109]。

人心杆菌和瓣膜心杆菌对包括青霉素在内的多种抗生素敏感[18,107]。极少产生 β-内酰胺酶，其酶的活性可以被克拉维酸抑制[105,110]。

紫色色杆菌对多种抗生素耐药(β-内酰胺类和黏菌素类抗生素)，但是多数紫色色杆菌对亚胺培南、氟喹诺酮类、庆大霉素、四环素和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑敏感[111]。溶血色杆菌耐药情况类似[21]。

类二氧化碳噬纤维营发酵单胞菌对四环素类、克林霉素、大环内酯类和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑敏感，而对头孢菌素类、氨基糖苷类和氟喹诺酮类耐药，对其他 β-内酰胺类抗生素和亚胺培南的敏感性不确定[64-65]。

啮蚀艾肯菌通常对青霉素、头孢菌素类、碳青霉烯类、多西环素、阿奇霉素和氟喹诺酮类敏感，但对窄谱头孢菌素类、大环内酯类和克林霉素耐药[107,112]。有文献报道，已检测到 β-内酰胺酶阳性的菌株，但其酶活性可以被 β-内酰胺酶抑制剂抑制[105,112]。

金氏菌属细菌通常对 β-内酰胺类、大环内酯类、四环素类、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑和氟喹诺酮类敏感[26,107]。文献中报道的产 β-内酰胺酶菌株对含有 β-内酰胺酶抑制剂的复合抗生素敏感[26]。

巴斯德菌属细菌对青霉素、广谱头孢菌素类、四环素类、氟喹诺酮类、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑和阿奇霉素敏感[113-114]。青霉素耐药的巴斯德菌属比较少见，但是耐药菌株的酶的活性可以被克拉维酸抑制[105]。对于分离自咬伤伤口的巴斯德菌属细菌不需要做常规药物敏感性试验；因为这类标本往往有多种微生物存在。针对这些微生物的经验治疗对多杀巴斯德菌也同样是有效的[105]。

米氏西蒙斯菌还没有被界定为致病菌，没有相应的药物敏感性试验数据。

念珠状链杆菌对青霉素和四环素类敏感，它们为主要治疗药物，同时对头孢菌素类、碳青霉烯类、氨曲南、克林霉素、红霉素和四环素敏感；对氨基糖苷类和氟喹诺酮类中度敏感，而对黏菌素和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑耐药[45]。针对念珠状链杆菌心内膜炎患者，需要选择高剂量青霉素 G 和一种氨基糖苷类抗生素联合治疗；氨基糖苷类抗生素可以加强青霉素 G 对细胞壁缺陷的 L-型念珠状链杆菌的抗菌作用[45,93]。

产吲哚萨顿菌的药物敏感性类似于 HACEK 群细菌[37]。

十、结果的评价、解释和报告

该组中一些细菌是人或动物口腔的定植菌，因此，对分离菌的临床意义评价比较困难。如果这些细菌是分离自无菌部位的纯培养，则应视为感染源，并且需报告药物敏感性试验结果。

对于通常有厌氧菌和需氧菌定植的标本，如口腔相邻的组织及伤口(如咬伤)的标本，本章中所介绍的细菌，可能是不致病的细菌或感染源。如果这些革兰阴性苛养菌占优势，即其他混合的需氧和厌氧菌群仅占少数，则必须对其进行细菌菌种鉴定和药物敏感性试验。

口腔感染通常由混合菌群引起，其中厌氧菌的数量超过需氧菌 10∶1[112]。即使典型的致病菌(如金黄色葡萄球菌或 β-溶血性链球菌)占优势，但少量存在的革兰阴性苛养菌也可能是相关的病原菌；克林霉素治疗口腔感染的常见经验治疗可以选择出对克林霉素耐药的大肠埃希菌[115]。在这些情况下，微生物实验室和临床医生之间需要加强合作，以讨论是否需对革兰阴性苛养菌进行重复培养，以便对该菌进行种水平的鉴定和进行药物敏感性试验。

参考文献请扫二维码查阅

第38章 嗜血杆菌属

MARK D. GONZALEZ, NATHAN A. LEDEBOER

（刘泽世 译；杜鸿、马筱玲 审校）

一、分类与命名

嗜血杆菌属(*Haemophilus* spp.)隶属于巴斯德菌科(Pasteurellaceae)[1]。尽管现已报道的嗜血杆菌的菌种数量远远超过使人类致病的菌种数量，但是目前与人类感染相关的主要有8个种，包括流感嗜血杆菌(*H. influenzae*)、埃及嗜血杆菌(*H. aegyptius*)、杜克雷嗜血杆菌(*H. ducreyi*)、皮特曼嗜血杆菌(*H. pittmaniae*)、副流感嗜血杆菌(*H. parainfluenzae*)、溶血嗜血杆菌(*H. haemolyticus*)、副溶血嗜血杆菌(*H. parahaemolyticus*)和副溶血嗜沫嗜血杆菌(*H. paraphrohaemolyticus*)。最近Norskov-Lauritsen等[2]根据对300株共生性的嗜血杆菌进行聚类分析，提出了一个新种——痰嗜血杆菌(*H. sputorum*)。痰嗜血杆菌β-半乳糖苷酶阴性，而形成一个与副溶血嗜沫嗜血杆菌密切相关的独特的聚类分支。痰嗜血杆菌可以从囊性纤维化患者的血液、痰或拔牙后的牙套中分离获得[2]。嗜沫凝聚杆菌(*Aggregatibacter aphrophilus*)、副嗜沫凝聚杆菌(*Aggregatibacter paraphrophilus*)和惰性凝聚杆菌(*Aggregatibacter segnis*)以前均归为嗜血杆菌属，现从分子生物学分类上划归为凝聚杆菌属(*Aggregatibacter*)(原放线杆菌)[3]。另外，嗜沫凝聚杆菌和副嗜沫凝聚杆菌现共同归为同一个种——嗜沫凝聚杆菌复合群[3]。新分类的嗜沫凝聚杆菌复合群的特性和流行病学特点具体见本书第37章。Kilian对嗜血杆菌属的分类学进行了综述[4]。

即使对某些种进行重新分类，嗜血杆菌属细菌中仍然存在显著的遗传多样性，基因组片段长度从1.8 Mb(流感嗜血杆菌)到2.8 Mb(杜克雷嗜血杆菌)[4]。DNA-DNA杂交显示在不同种之间存在高度异质性；如同参考文献[5]所描述，Burbach等的研究证实流感嗜血杆菌和属内其他种的结合率从10%[副兔嗜血杆菌(*H. paracuniculus*)]到70%(埃及嗜血杆菌)。其中流感嗜血杆菌和埃及嗜血杆菌基因组同源性最高，达90%；而和杜克雷嗜血杆菌只有18%同源性。另外，种内的异质性同样明显，在流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌的菌株中有50%～100%的异质性[4]。

嗜血杆菌属是一群细小的、无动力、无芽胞、非抗酸性、呈多形态的革兰阴性苛养菌。形态多为球杆菌或短杆菌，其细胞壁和其他革兰阴性杆菌类似，但相比于巴斯德菌科的其他成员，其含有更少的脂肪酸[1,4-5]；嗜血杆菌的脂多糖结构不同于肠杆菌科细菌[1,4-5]，其细胞壁的脂肪酸组成包括*n*-十四烷酸盐(14:0)、3-羟基十四烷酸酯(3-OH-14:0)、*n*-十六酸盐(16:0)和十六酸盐(16:1)[6]。在流感嗜血杆菌和埃及嗜血杆菌的细胞壁上观察到有菌毛存在[4]。嗜血杆菌属基因组的特征是DNA G+C含量为37%～45%[1,4,7]。

嗜血杆菌属兼性厌氧，生长需要Ⅹ因子和(或)Ⅴ因子。Ⅹ因子是原卟啉Ⅸ，是氯化血红素生物合成途径中的一个代谢中间产物[4]。Ⅴ因子是由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)或NAD磷酸盐(NADP)组成。而红细胞中富含这2种因子(故在希腊语中名为“嗜血”)。嗜血杆菌不同种对因子的需求各不相同，流感嗜血杆菌、埃及嗜血杆菌和溶血嗜血杆菌都需要Ⅹ因子和Ⅴ因子同时存在才能生长，而其他嗜血杆菌生长只需要其中某一个因子(表38-1)。嗜血杆菌属在35～37℃、5%～7% CO_2条件下生长最佳。流感嗜血杆菌、埃及嗜血杆菌、杜克雷嗜血杆菌、皮特曼嗜血杆菌、副流感嗜血杆菌、溶血嗜血杆菌、副溶血嗜血杆菌、

副溶血嗜沫嗜血杆菌和痰嗜血杆菌氧化酶阳性。流感嗜血杆菌、埃及嗜血杆菌、溶血嗜血杆菌和副溶血嗜沫嗜血杆菌触酶阳性。副流感嗜血杆菌、副溶血嗜血杆菌和惰性嗜血杆菌触酶反应因菌株而异[1]。

嗜血杆菌属通常在巧克力琼脂上生长良好，呈光滑、扁平或凸起，直径为 0.5～2.0mm 的无色(浅黄色或浅褐色)或淡黄色菌落。某些种在含羊血的琼脂上生长时可产生 β-溶血(表 38-1)。肉汤中呈均匀浑浊或颗粒状生长。

表 38-1 嗜血杆菌属种间鉴别特征[a]

菌名	生长需求			发酵试验					产物				溶血
	X因子	V因子	触酶	葡萄糖	蔗糖	乳糖	木糖	甘露糖	吲哚	尿素	鸟氨酸脱羧酶	β-半乳糖苷酶	
流感嗜血杆菌	+	+	+	+	−	−	+	−	v[b]	v[b]	v[b]	−	−
埃及嗜血杆菌	+	+	+	+[c]	−	−	−	−	−	+	−	−	−
溶血嗜血杆菌	+	+	+	+	−	−	v	−	v	+	−	−	+
副流感嗜血杆菌	−	+	v	+	+	−	−	+	v[b]	v[b]	v[b]	v	−
杜克雷嗜血杆菌	+	−	−	v	−	−	−	−	−	−	−	−	−[d]
副溶血嗜血杆菌	−	+	v	+	+	−	−	−	−	+	−	v	+
皮特曼嗜血杆菌	−	+	w	+	+	−	−	+	uk	uk	uk	+	+
副溶血嗜沫嗜血杆菌[e]	−	+	+	+	+	−	−	−	−	+	−	v	+
痰嗜血杆菌	−	+	uk	+	uk	−	−	−	+	+	−	+	+[f]

注：[a]缩写，+. 阳性；−. 阴性；uk. 未知；v. 反应不定；w. 弱反应。[b]吲哚、脲酶和鸟氨酸脱羧酶试验主要用于流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌的生物分型(表 38-2)。[c] 90%以上菌株都发生延迟的阳性反应。[d] 11%～89%菌株溶血现象延迟。[e] CO_2 浓度≥10%有利于细菌生长。[f]在马血或羊血的琼脂中产生 β-溶血；偶尔会有菌株不产生 β-溶血

嗜血杆菌属细菌中除了杜克雷嗜血杆菌外，通常能广泛发酵不同的生化反应底物。葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘露糖和木糖发酵试验可用于嗜血杆菌属内种的鉴别。产吲哚、鸟氨酸脱羧酶、脲酶、触酶和 β-半乳糖苷酶试验及在含羊血的琼脂上产生 β-溶血等特征在嗜血杆菌属菌种中是可变的，可辅助进行菌种鉴定(表 38-1)。

流感嗜血杆菌可能产生 6 种不同的荚膜多糖中的一种或不产生荚膜，无荚膜的流感嗜血杆菌则被称为未分型流感嗜血杆菌(NTHi)[8](图 38-1)。荚膜血清分型基于荚膜多糖抗原成分的不同，可将菌株分为 6 个不同的血清型 a～f。根据菌株类型不同，荚膜可由呋喃糖环中的核糖、果糖和吡喃糖环中的葡萄糖、半乳糖、*N*-乙酰葡糖胺或 N-乙酰甘露糖胺构成。不同血清型的荚膜结构见参考文献[5]。可依据吲哚试验、鸟氨酸脱羧酶和脲酶试验对流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌进行生物分型[9](表 38-2)。

表 38-2 流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌生物分型

菌株	生物型	产物		
		吲哚	脲酶	鸟氨酸脱羧酶
流感嗜血杆菌	Ⅰ	+	+	+
	Ⅱ	+	+	−
	Ⅲ	−	+	−
	Ⅳ	−	+	+
	Ⅴ	+	−	+
	Ⅵ	−	−	+
	Ⅶ	+	−	−
	Ⅷ	−	−	−

（续 表）

菌株	生物型	产物		
		吲哚	脲酶	鸟氨酸脱羧酶
副流感嗜血杆菌	Ⅰ	−	−	+
	Ⅱ	−	+	+
	Ⅲ	−	+	−
	Ⅳ	+	+	+
	Ⅴ	−	−	−
	Ⅵ	+	−	+
	Ⅶ	+	+	−
	Ⅷ	+	−	−

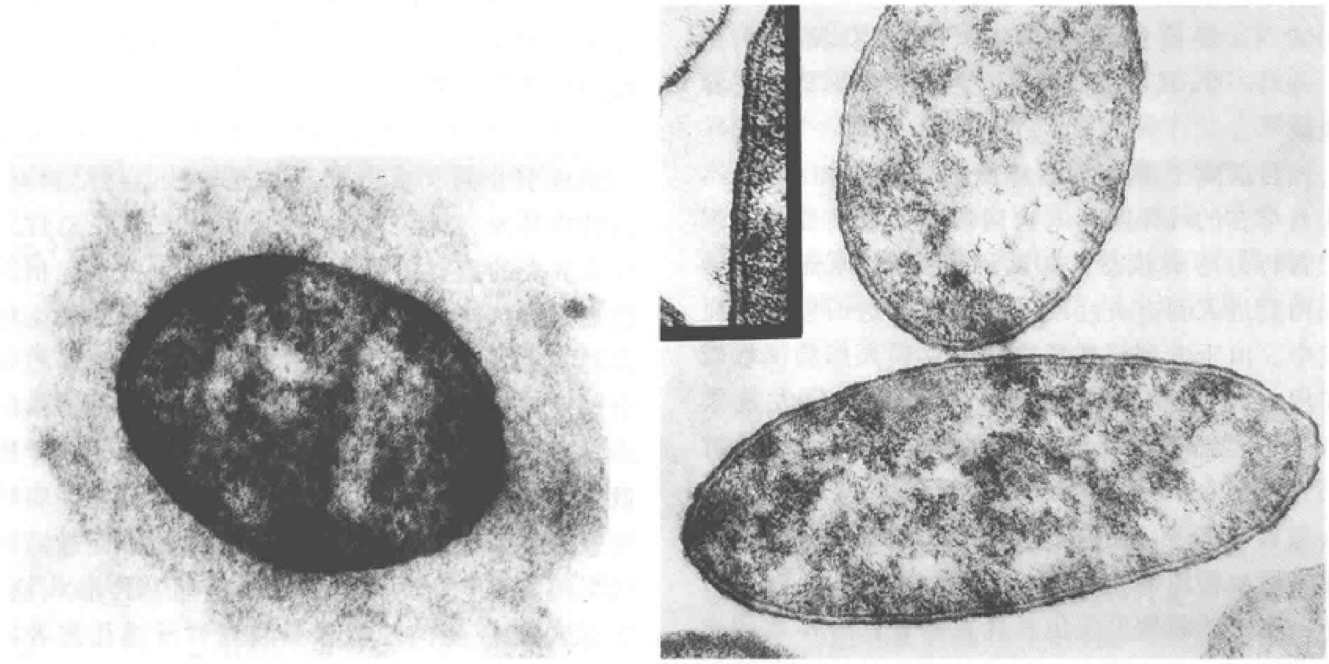


图 38-1 流感嗜血杆菌电镜图，左侧为有荚膜的 b 型流感嗜血杆菌，右侧为无荚膜、未分型的流感嗜血杆菌

二、流行病学和传播

嗜血杆菌属细菌寄生在人体的黏膜，通常副流感嗜血杆菌和皮特曼嗜血杆菌在口腔黏膜的定植较上腭弓更为常见[4,10-13]。尽管已从牙龈下的牙菌斑中分离出溶血嗜血杆菌，副溶血嗜血杆菌和溶血嗜血杆菌还是很少在健康个体中定植[4]。子宫颈部位的杜克雷嗜血杆菌已被证实可引起性传播疾病[14-15]。

流感嗜血杆菌被发现也可寄居在许多健康个体的上呼吸道黏膜表面[16]，但有荚膜的 b 型流感嗜血杆菌引起上呼吸道无症状的定植现象是很少见的。在 20 世纪 80 年代，据报道在疫苗接种前仅有 2%～5% 的健康儿童携带 b 型流感嗜血杆菌(Hib)，而自从引进儿童 b 型流感嗜血杆菌结合抗原疫苗 HIB 后已进一步下降到 0.06%[17]。与之相反，90% 以上健康个体的咽喉和鼻咽部的菌群以无荚膜的流感嗜血杆菌（未分型菌株）和副流感嗜血杆菌为主[11,18]，无症状的携带者其上呼吸道定植的未分型流感嗜血杆菌克隆株和感染者是有区别的[18-19]。在无症状的定植机体中，定植的克隆株不断发生改变，每 1～2 个月就有所不同[19]。有趣的是，DeMuri 等[20] 发现在感染上呼吸道病毒期间，肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌的密度增加了 0.4～1.0 $\log_{10}$。然而，在感染过程中，以单一的克隆株占主导地位。随着 b 型流感嗜血杆菌疫苗的广泛应用，由各类血清型

引起的侵袭性感染状况发生了改善。美国疾病预防控制中心(CDC)最近的一项报道表明,1999—2008年期间69.5%的侵袭性菌株是未分型菌株,2.2%是a型,3.6%是b型,0.3%是c型,0.3%是d型,5.7%是e型,还有18.3%是f型[21]。尽管b型流感嗜血杆菌携带率在降低,以及疫苗的接种有效阻止了侵袭性感染,但是在阿拉斯加原住民和美洲印第安人中,流感嗜血杆菌及b型流感嗜血杆菌引起的侵袭性感染发病率仍然较高,在这些人群中a型引起的感染发病率也很高[21]。近年来,在65岁以上患者中发现侵袭性流感嗜血杆菌发病率在上升[21-22],MacNeil等[21]报道在1999—2008年,侵袭性流感嗜血杆菌感染发生率是4.09/10万,其中19.5%的侵袭性感染发生在养老院[21]。

目前对于流感嗜血杆菌的潜伏期知之甚少,先前存在的或伴随而来的病毒感染可使健康的携带者转为感染状态。在这种情况下,原先定植的细菌就进入到有炎症或破损的黏膜进而侵入到血流中。由于b型流感嗜血杆菌荚膜天然的抗吞噬作用及机体没有抗荚膜抗体致使细菌大量繁殖[16]。当细菌浓度超过临界值时,细菌可以播散到身体多个部位,如脑膜、皮下组织、关节、胸膜、心包和肺部等。抗体、补体及吞噬细胞的出现将促进菌血症的清除,阻止其播散[16]。

宿主的防御反应包括经典和替代补体激活途径及针对b型流感嗜血杆菌荚膜上的磷酸多核糖基核糖醇(PRP)产生抗体。b型流感嗜血杆菌荚膜抗体的出现在获得性免疫中起着主要作用,新生儿由于从母亲初乳中获得母体抗体,从而感染流感嗜血杆菌的风险较低。当婴儿约2个月大时,从母体获得的针对荚膜PRP成分的抗体逐渐消失,婴儿发生侵袭性流感嗜血杆菌感染的风险性增高,此时,来自母体的抗体消失,以及随之而来的自然感染,婴儿抗PRP免疫反应减弱[16]。由于婴幼儿先前的感染并没有使其获得免疫力,故容易反复感染。大部分儿童直到约5岁才自然产生获得性抗体。

三、临床意义

(一)流感嗜血杆菌

流感嗜血杆菌是一组多样化的生物群,引起人类多种疾病。为了更好地将流感嗜血杆菌分组,Doern等根据吲哚、脲酶和鸟氨酸脱羧酶试验将其分为八个生物型[9]。由流感嗜血杆菌引起的侵袭性感染,如脑膜炎、会厌炎、眶蜂窝织炎及菌血症等,通常是由有荚膜的b型菌株引起,一般此类菌株属于生物Ⅰ和Ⅱ型[23]。但值得庆幸的是,随着小儿流感嗜血杆菌疫苗的发展和应用,危及生命的嗜血杆菌感染在发达国家已变得很罕见[24-26]。如今,尽管b型流感嗜血杆菌可以在儿童和成人中引起头部创伤、脑脊液漏或神经外科术后感染,但通常还是好发于未接种疫苗的儿童。在疫苗使用前,流感嗜血杆菌生物Ⅳ型菌株常见报道可引起新生儿系统性感染和产后女性生殖系统的侵袭性感染[27-28]。

现今,绝大多数流感嗜血杆菌感染是由未分型菌株引起的[8,18],这类菌株是导致急性结膜炎、急性中耳炎、急性上颌窦炎、慢性支气管炎急性发作及肺炎的重要病因[16]。菌株从上呼吸道定植部位通过直接侵入相邻部位引起感染。流感嗜血杆菌通常经呼吸道分泌物传播,患者手上携带的未分型菌株也可以导致结膜炎。对于由病毒感染而继发咽鼓管炎和鼻窦炎的患者,感染易进一步播散至邻近部位的中耳道和上颌窦[29]。任何削弱呼吸道黏膜纤毛清除细菌能力的因素均可促进肺部感染的发生[16,30-31],如吸烟、慢性阻塞性肺疾病、病毒感染、反复的细菌感染及囊性纤维化患者发生的生理改变[16,30-31]。人类易发生系统性的未分型菌株感染,尤其是老年人,以及那些功能性或解剖学上的无脾症、镰状细胞贫血、补体缺陷、霍奇金淋巴瘤、先天性或获得性低丙种球蛋白血症及T细胞免疫缺陷(如HIV感染)患者。很少有报道未分型菌株会引起菌血症,在最近的研究中,Laupland等[32]发现未分型菌株菌血症的发病率大约每年只有304/33 601 000,这可能是由于该种细菌基本上无毒力,或是传统血培养技术不足以分离出这种苛养菌,又或许是缺乏同期侵袭性流感嗜血杆菌感染的流行病学研究。

(二)杜克雷嗜血杆菌

软下疳(chancroid)是一种由杜克雷嗜血杆菌引起的性传播疾病,在接触病原菌2~7天后生殖器出现单个疼痛性溃疡并伴有腹股沟淋巴结炎[33-35]。杜克雷嗜血杆菌感染人体皮肤后首先遇

到的细胞很可能是角质细胞，杜克雷嗜血杆菌和角质细胞间的相互作用对于形成感染是很重要的[36]。软下疳通常发生在发展中国家，包括亚洲、非洲和拉丁美洲的国家在内。此类疾病的流行主要与社会经济地位低下、卫生知识匮乏、卖淫及吸毒等有关，商业化的性工作者也被认为是杜克雷嗜血杆菌的传染源。1987 年以后，美国所报道的软下疳病例在稳步下降，直到 2001 年，从那时起，每年所报道的患者数在 17～55 例之间。2015 年，只有 11 例软下疳病例被报道 CDC，有 7 个州至少报道 1 例[37]。由于难以建立杜克雷嗜血杆菌感染的病原学诊断及许多流行的国家资源有限，软下疳真实的发病率并不清楚。由于诊断技术欠缺和漏报，杜克雷嗜血杆菌在美国和其他发达国家的发病率是未知的，这很可能使软下疳成为一个较当前报道的更重要的引起生殖器溃疡的病因。

(三)其他嗜血杆菌

由于人体口腔和咽喉部 75%的嗜血杆菌生物群都是副流感嗜血杆菌，故副流感嗜血杆菌被认为是上呼吸道定植的主要菌种，但有趣的是，副流感嗜血杆菌并不常规定植在鼻腔部。该菌被认为至少与某些疾病如急性中耳炎、急性鼻窦炎、慢性支气管炎急性发作相关，尽管该菌在这些疾病中的具体作用经常并不确定。副流感嗜血杆菌极少情况下也会导致亚急性细菌性心内膜炎。它是 HACEK 细菌群的 H(其他菌属包括放线杆菌属、心杆菌属、艾肯菌属和金氏杆菌属)。在由未分型流感嗜血杆菌引起的系统性感染病例中，副流感嗜血杆菌感染性心内膜炎患者血培养可能会出现假阴性，这是由于病原菌的苛养性及血培养瓶中高浓度的聚茴香磺酸钠成分造成细菌溶解所致[38-40]。

埃及嗜血杆菌是嗜血杆菌属中一个特殊的种，与流感嗜血杆菌生物Ⅲ型很相似，该菌被称为结膜炎嗜血杆菌，是引起急性化脓性结膜炎的重要病因[41]。急性化脓性结膜炎，俗称“红眼病”，好发于年幼的儿童，尤其是在一些封闭场所中与其他儿童有密切接触的小儿，如托儿所和小学教室。该病以急性的结膜炎症、视力障碍、眼痛和瘙痒为特征，常累及双眼并具有高度传染性。

巴西紫癜热多发生于南美洲，临床表现以急性高热、低血压、弥散性皮肤紫癜、突发血管损伤为特征[42]。该病的病原体常被误认为是埃及嗜血杆菌，后经证实为流感嗜血杆菌生物Ⅲ型[42,43]。该型细菌不能发酵 D-木糖，有特殊的管家基因和独特的 rRNA 限制性酶切图谱，可抵抗血清杀菌活性，是已知的流感嗜血杆菌生物型中一类独特的类型[4]。

溶血嗜血杆菌在美国一直被报道可引起侵袭性感染，可能被错误鉴定为流感嗜血杆菌[44]。Anderson 等[44]的研究回顾性评估了 2009－2010 年分离的 161 株和 1991－2000 年分离的 213 株未分型流感嗜血杆菌，并确认了其中有 7 株与菌血症、化脓性关节炎或腹膜炎相关的菌株曾经被错误地鉴定为流感嗜血杆菌，这 7 例通过微生物表型鉴定技术鉴定为流感嗜血杆菌的菌株都表现为溶血不全或不溶血。该研究强调了分子鉴定技术在鉴定未分型流感嗜血杆菌中的重要性。

其他嗜血杆菌很少引起人类感染，尽管有下呼吸道感染、鼻窦炎、结膜炎、菌血症、脑膜炎、伤口感染、腹膜炎、关节炎、骨髓炎及脑脓肿的个案报道或小型系列研究[6,45]。

四、标本的采集、运输和储存

嗜血杆菌感染诊断标本的采集，前提是要有感染性质的评估。具体的采集和转运方法详见第 19 章。当患者疑有脑膜炎时，应采集血液和脑脊液标本送检。对于中耳炎患者，鼓膜穿刺术取得的中耳穿刺液是一个有意义的标本，但对于鼓膜穿孔和耳漏症的患者，从外耳道收集的中耳引流液标本也是可取的。对于上颌窦炎患者，可从鼻窦内直接吸取标本或在内镜引导下采集鼻拭子标本。当考虑患者为嗜血杆菌性结膜炎时，必须采集结膜拭子标本送检。对怀疑有嗜血杆菌引起的支气管肺部感染的患者，应从下呼吸道采集标本，以避免口腔正常菌群的污染。也就是说，当考虑患者为嗜血杆菌引起的支气管肺部感染时，应采集如支气管肺泡灌洗液或支气管冲洗液(次选)等特异性较好的标本。尽管痰和气道吸引物的采集创伤性更小，但很难将其中的病原体和口腔的正常菌群分离开来。当患者疑有细菌性肺炎时，还应做血培养。重要的是，鼻部、鼻咽部及鼻拭子标本在评估患者呼吸道疑似嗜血杆菌感染方面毫无价值。有一点除外，即囊性纤维化患者病情加剧

时，在这种情况下，通过将拭子插入患者咽后部引起深咳而取得的标本或许是有价值的[46]。当正常无菌部位（如胸膜腔、滑膜、心包或腹膜）怀疑有嗜血杆菌感染时，应无菌采集相应部位的穿刺液送检，血培养也应同时进行。

最后，对于培养杜克雷嗜血杆菌的标本，应用生理盐水或肉汤浸湿的棉拭子从生殖器损伤部位的基底部取材，取样后标本应立即运送到实验室并及时接种，以防细菌丧失活力。当患者临床疑似软下疳时，医务人员应将此信息告知实验室，以便实验室选择适合杜克雷嗜血杆菌生长的培养基接种。如果标本不能及时转运，拭子标本应在采集的时候就直接接种或放在含有氯化血红素的转运培养基中[47]。当冷藏（4℃）时，Amies 运送培养基可以使杜克雷嗜血杆菌保持存活达 3 天；或使用特殊配制的含有白蛋白和谷氨酰胺成分的巯基乙酸-氯化血红素培养基，可保持细菌存活 3 天以上[34,48]。有关棉拭子和液体的 Amies 转运培养基对于杜克雷嗜血杆菌存活率影响的报道甚少，还需要进一步研究。尽管最佳的杜克雷嗜血杆菌培养标本是来源于溃疡部位的取材，但淋巴结抽吸物、脓液及腹股沟淋巴结抽吸液也可用于培养（敏感性不如溃疡部位标本）。当从这些标本中分离培养杜克雷嗜血杆菌时，实验室应考虑允许临床医生直接将标本接种于平板上，以获得最理想的培养结果。尽管还没有开展大规模的研究来评估特殊转运培养基的有效性，但用于杜克雷嗜血杆菌核酸扩增的标本还是应采用标准采集技术从生殖器部位采集。

一般通过冻干法或将菌株接种到含有>10%甘油的胰蛋白胨大豆肉汤或多孔磁珠后冻存于−80～−60℃来完成嗜血杆菌的长期保存（Pro-Lab Diagnostics，Round Rock，TX）。

五、直接检查

（一）显微镜检查

在染色形态上，嗜血杆菌是一群细小、呈多形性的革兰阴性球杆菌，多呈球状、球杆状、杆状或丝状（图 38-2）。由于嗜血杆菌形态的多形性，革兰染色涂片须仔细观察以避免和其他革兰阴性菌如脑膜炎奈瑟菌（*Neisseria meningitidis*）、布鲁菌（*Brucella* spp.）或弗朗西丝菌（*Francisella* spp.）相混淆。若革兰染色脱色时间不够，则易将菌株误认为是肺炎链球菌（*Streptococcus pneumoniae*）、单核细胞性李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）或无乳链球菌（*Streptococcus agalactiae*）。

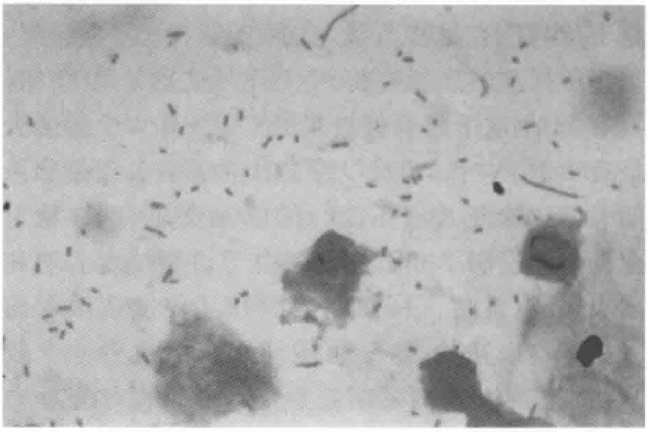


图 38-2 脑脊液标本中流感嗜血杆菌革兰染色形态，见彩插

实验室在接到脑脊液标本后应在 1 h 内进行革兰染色，并直接将结果报告给开具申请单的临床医生。对于不浑浊的脑脊液标本，用细胞离心机以 10 000×g 离心 10 min，制备浓缩涂片。对于明显浑浊的标本，除了制备细胞离心涂片外，还应直接涂片。涂片应及时进行革兰染色，观察多形核白细胞及嗜血杆菌形态的细菌。在极少数情况下，脑脊液的革兰染色涂片发现大量多形核白细胞而未观察到细菌，此时应再准备另一张细胞离心涂片用吖啶橙染色（acridine orange stain）。

用于脑脊液标本革兰染色涂片的方法同样适用于胸腔积液、腹水、关节液及心包液标本。中耳引流液和鼻窦抽吸物标本无须经细胞离心，直接涂片革兰染色即可。

下呼吸道分泌物的革兰染色可以从标本直接制备（如咳出的痰、气管内吸痰标本、支气管活检标本、支气管刷检标本和开胸术标本），或细胞离心后制备（如支气管冲洗液和支气管肺泡灌洗液）。

革兰染色涂片若观察到一群细小、似“铁轨”排列的革兰阴性杆菌，应高度怀疑是杜克雷嗜血杆菌。然而，生殖器部位标本的革兰染色用于杜克雷嗜血杆菌的检测是有争议的，因为绝大多数的生殖器溃疡都有混合细菌，这使得革兰染色结

果难以解释。此外，标本通过革兰染色检测杜克雷嗜血杆菌的阳性率低于培养或核酸扩增检测。

(二)抗原检测

商业化的免疫化学检测技术可直接从脑脊液和其他体液标本中检测肺炎链球菌、停乳链球菌(*Streptococcus dysgalactiae*)、流感嗜血杆菌和脑膜炎奈瑟菌。现有流感嗜血杆菌试剂盒专门检测 b 型流感嗜血杆菌。尽管这些技术提供了病原体的快速鉴定，但是与革兰染色相比，它们缺乏敏感性与特异性[49]。因此，流感嗜血杆菌抗原检测的临床应用价值有限，其结果通常也不理想。然而，对于特殊的临床情况，如在资源受限的地区，当疾病高度流行且常规培养不可靠时，抗原检测方法可能是有用的。

(三)分子生物学检测技术

现已发展了主要基于 PCR 的核酸扩增检测方法，用于直接检测各类临床标本如脑脊液、血浆、血清及全血中的流感嗜血杆菌[26,50]。这些检测技术可同时检测某些特殊感染性疾病(如脑膜炎)中存在的多种常见病原体。尽管各类文献中提到这些方法的检测敏感性各不相同，但特异性普遍较好[51-53]。

有研究证实，依据临床表现和病史诊断软下疳的准确率为 33%～80%[54]，培养的敏感性不超过 75%[55,56]，这使得分子检测成为软下疳最理想的检测手段。现已发展了从临床标本中直接检测杜克雷嗜血杆菌的分子检测策略。通过设计各种引物已用于扩增杜克雷嗜血杆菌的 16S rRNA 基因、*rrs*(16S)-*rrl*(23S)核糖体基因间隔区、杜克雷嗜血杆菌 DNA 克隆编码的未知片段或编码杜克雷嗜血杆菌热休克蛋白的 *groEL* 基因[55]。其中一个策略包括氯仿抽提 DNA，随后进行单管巢式 PCR 定向扩增 16S rRNA 基因，较长的外引物用高退火温度，较短的内引物用生物素和洋地黄毒苷标记用于结合链霉亲和素及进行比色检测[57]。另一个策略就是将 *hhdA* 基因作为靶基因，利用该靶标的检测程序已由 Chen 和 Ballard 报道[58]。与培养或临床诊断相比，PCR 直接检测临床标本的敏感性为 83%～95%[55,57]。分子检测手段对于软下疳的临床诊断有较好的敏感性，在疾病流行地区，尤其是在培养困难或无法开展培养的情况下，该检测具有明显的优势。

除了可以从临床标本中直接检测杜克雷嗜血杆菌，也有研究将 PCR 用于标本中流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌的直接检测。在 Kuhn 等[59]的研究中，作者比较了用于感染性心内膜炎相关病原体检测的 3 种商品化 PCR 检测方法，结果表明与全血和瓣膜组织的培养相比，PCR 具有优越的性能，其敏感性高达 85%，而全血和心脏瓣膜组织的培养只有 45%。然而，尽管该研究提示 PCR 检测具有较高的敏感性，但由于用培养阴性的标本进行比较，其特异性较低(40%)，这可能是与收集标本之前患者已使用抗生素治疗有关[59]。在另一项关于脑膜炎的研究中，Wu 等[60]证实了与常规培养相比，实时荧光定量 PCR 和革兰染色可较少受到使用抗生素的影响，革兰染色可用于流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌和肺炎链球菌检测。该研究进一步表明了 PCR 和革兰染色的敏感性远超过培养(三者分别为 95.7%、98.25%和 81.3%)，从 33 例(总样本 451 例)培养阴性的脑膜炎患者标本中检出病原菌[60]。另有研究评估了从呼吸道标本检测嗜血杆菌的分子方法[61-63]，显示其敏感性高达 95%，但并没有证明流感嗜血杆菌与临床疾病的相关性。

最近，FilmArray 脑膜炎/脑炎平台(BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT)从 200 μl 脑脊液标本中直接检测细菌($n=6$)、病毒($n=7$)和真菌($n=1$)病原体，获得了美国 FDA 的许可。平台研究包括流感嗜血杆菌，在 4 项独立研究的总共 9 个临床样本中对该菌进行检测。这些检测中有 7 项是经培养确认的，其余 2 项是通过辅助方法确认的[65-68]。为了更好地评估 FilmArray 脑膜炎/脑炎平台检测流感嗜血杆菌血清型范围(包括 NTHi)的性能，还需要进行更多的研究。FilmArray 脑膜炎/脑炎平台结合 2 种检测方法检测血清型 a 至 f 和 NTHi，但只报道一个“流感嗜血杆菌”的结果。

在某些其他标本中，尤其是呼吸道标本，通常存在共生的嗜血杆菌，这就使得阳性结果难以确定。另外，其他共生菌的存在或预先使用抗生素都会导致假阳性结果，使得特异性较低。鉴于这些原因，在没有建立针对呼吸道标本有临床意义的分子定量检测阈值前，不提倡应用分子技术直接从临床标本中检测嗜血杆菌。

六、培养流程

(一)培养基

嗜血杆菌最佳的分离培养需要使用特殊的营养培养基才能满足这些苛养菌的生长要求，培养基中必须含有至少 10 μg/ml 的游离 X 因子和 V 因子。高浓度的 X 和 V 因子可以从全血中获得，其中大部分游离于红细胞内。X 因子是一种原卟啉Ⅸ，可来源于全血或利用结晶氯化血红素加入到细菌培养基中获得，标准的血平板可提供 X 因子。V 因子是由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)或烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)组成的，也较易从血中获得。然而，由于烟酰胺存在于细胞内，以及血液内存在 NAD-糖水解酶，其通常不易发挥生物效应。为了使嗜血杆菌能在固体培养基上生长，须添加终浓度为 10 μg/ml 的结晶氯化血红素和 NAD，或在培养基中加入血液时应加热使得红细胞发生裂解，从而释放 X 和 V 因子到培养基中。后者操作步骤就是待经高压灭菌处理后的基础培养基冷却至 80℃时加入血液，由此成为巧克力色血液。为了嗜血杆菌能更好地生长，应加入含有 5% 巧克力色的绵羊血[1]。

嗜血杆菌属细菌，尤其是生长条件较苛刻的嗜血杆菌，如杜克雷嗜血杆菌和埃及嗜血杆菌的生长除了需要 X 和 V 因子外还需要添加其他多种生长因子。能提供这些生长因子的 2 个市售添加剂是 IsoVitaleX(BD)和 Vitox(ThermoFisher)。这些生长因子包括葡萄糖、胱氨酸、谷氨酰胺、腺嘌呤、硫胺素、维生素 B_{12}、鸟嘌呤、铁和氨基苯甲酸，以满足杜克雷嗜血杆菌和埃及嗜血杆菌的生长需求。

含有 5% 裂解的绵羊红细胞和 1% IsoVitaleX 或 1%Vitox 添加剂的巧克力营养培养基现已成为临床实验室常用的培养嗜血杆菌的通用培养基(图 38-3)。另一种用于促进嗜血杆菌生长的培养基是 Levinthal 培养基[69]，该培养基本身是透明的，有利于观察到菌落虹彩，此特性常与荚膜有关(图 38-4)[70-71]。一项研究发现，由淋球菌琼脂基质、5%加热的绵羊红细胞和 1%酵母自溶物所制成的培养基能提供除了杜克雷嗜血杆菌以外其他嗜血杆菌的最佳生长条件[72]。

呼吸道标本中有其他培养条件不太苛刻的共生菌生长，所以成了从呼吸道标本中分离嗜血杆菌的一个重大挑战。可在培养基中联合加入杆菌肽、万古霉素和(或)克林霉素抑制共生菌的生长，从而保证嗜血杆菌的生长[73]。对于囊性纤维化、慢性支气管炎急性发作、结膜炎和会厌炎患者来说，使用上述选择性培养基从呼吸道标本中分离嗜血杆菌显得尤为重要(图 38-5)[74]。各种配方的嗜血杆菌选择性培养基市场上均有售，包括嗜血杆菌分离培养基(ThermoFisher)和含有杆菌肽的嗜血杆菌分离培养基(BD)。这些培养基含有牛心浸出液琼脂与酪蛋白胨以满足嗜血杆菌的营养要求，兼有的马血成分可以提供 X 和 V 因子，同时可以区别嗜血杆菌有无溶血。加入的杆菌肽可以抑制正常菌群包括奈瑟菌属(*Neisseria* spp.)的生长。

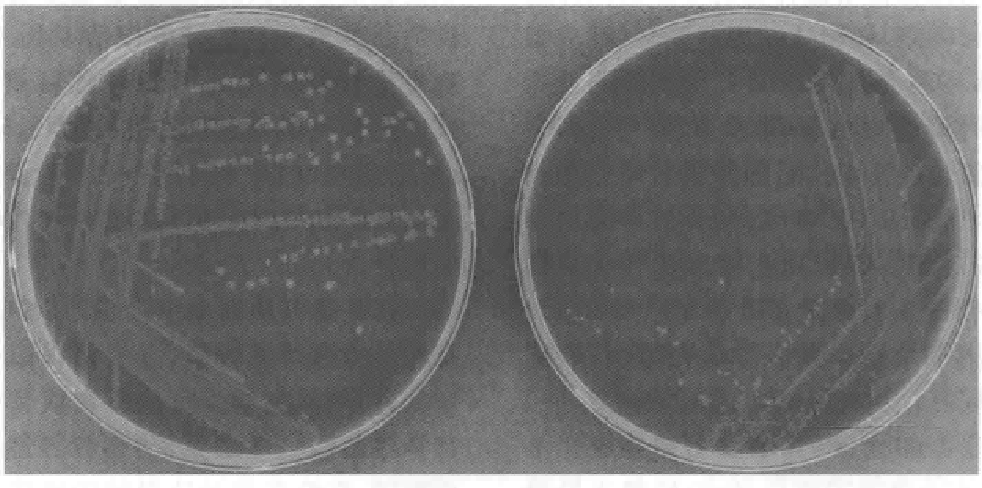


图 38-3 流感嗜血杆菌在巧克力培养基上的菌落形态，左侧为有荚膜的 b 型流感嗜血杆菌菌落形态，右侧为无荚膜的流感嗜血杆菌菌落形态，见彩插

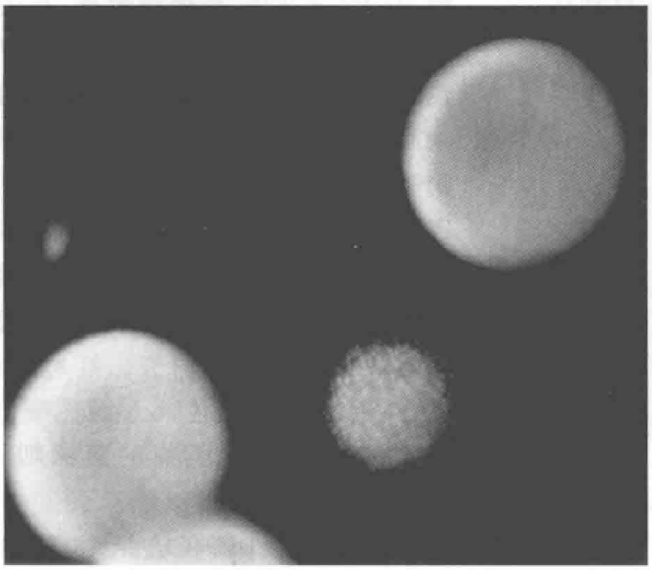


图 38-4 流感嗜血杆菌在Levinthal培养基上的菌落形态，左侧和右侧为有荚膜的b型流感嗜血杆菌菌株，中间为无荚膜菌株。注意有荚膜菌株显示明显的虹彩，见彩插

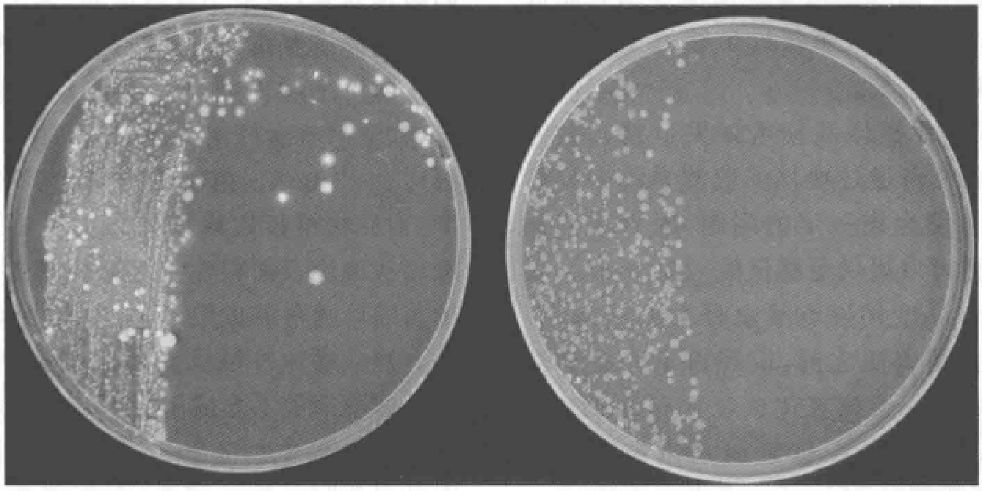


图 38-5 囊性纤维化患者痰标本中流感嗜血杆菌菌落生长情况，左侧为普通的巧克力营养琼脂，右侧为添加杆菌肽、克林霉素和万古霉素的巧克力营养琼脂，见彩插

选择性培养基的使用同样有助于从生殖道标本中分离培养杜克雷嗜血杆菌[48]。选择性培养基可以使用以下任何一种：GC琼脂基础加上1% IsoVitaleX、5%胎牛血清、1%血红蛋白和3 μg万古霉素；GC琼脂基础加上5% Fildes营养剂、5%马血和3 μg万古霉素；含5%新鲜兔血琼脂加上3 μg万古霉素或者M-H琼脂加入5%马血、1%IsoVitaleX和3 μg万古霉素[48]。为了保证杜克雷嗜血杆菌最适生长，可以同时使用2种不同的选择性培养基[48]。

嗜血杆菌可以通过卫星现象在含5%绵羊血琼脂上生长，尽管并不推荐此方法作为实验室常规检测。关于卫星试验，首先将怀疑为嗜血杆菌的细菌接种在血琼脂上，然后在琼脂表面接种一条产生溶血的葡萄球菌(*Staphylococcus* spp.)生长线。葡萄球菌产生的溶血素可以迅速裂解生长线附近的红细胞，从而释放足量的X因子(氯化血红素)和V因子(NAD)到培养基中以供嗜血杆菌生长需要，葡萄球菌还可以沿生长线分泌NAD到培养基中，因而嗜血杆菌可沿葡萄球菌生长线附近生长，此现象被称为"卫星现象"(图38-6)。除葡萄球菌外其他细菌也能和嗜血杆菌产生卫星现象，如肠球菌(enterococci)和酵母菌(yeast)。

尽管嗜血杆菌不是导致菌血症的常见原因，但是随着现代化、连续监测的血培养系统的使用，无须再用特殊的检测方法即可从血液标本中分离培养嗜血杆菌[6,75]。血培养系统中所使用的肉汤培养基可提供嗜血杆菌属细菌生长所需营养，这

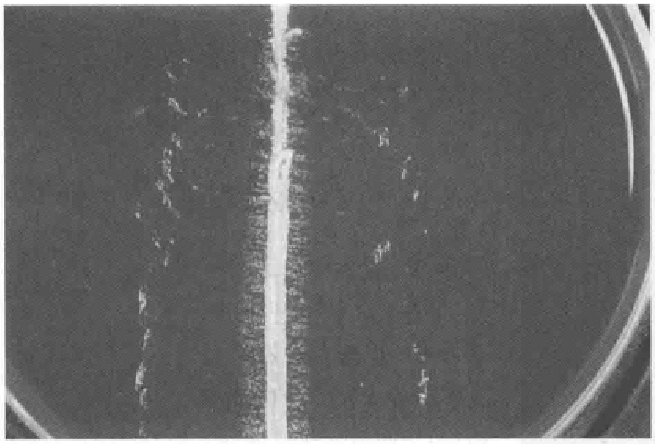


图 38-6 流感嗜血杆菌卫星现象，在含 5%绵羊血琼脂平板上，见彩插

是因为当血液标本加入血培养肉汤培养基时血液中的红细胞发生裂解，从而释放足够的 X 因子和 V 因子供嗜血杆菌生长。

然而，一般的无菌体液标本如关节液、腹水、心包液和胸腔积液若通过血培养监测系统来分离培养嗜血杆菌可能存在一定的问题，因为这些标本不像血液一样可以提供足够量的 X 因子和 V 因子。在这些标本高度怀疑有嗜血杆菌的情况下，将标本接种入血培养瓶之前，应在血培养瓶中每毫升添加至少 10 μg 无菌氯化血红素和 NAD，以满足嗜血杆菌生长需求。也可加入市售的添加剂，如 Fildes 营养剂(BD)用于培养嗜血杆菌。

当细菌接种到固体培养基后应置于 35～37℃，含 5%～7% CO_2 湿润的气体环境中孵育培养。在此条件下，绝大多数嗜血杆菌在 24～48 h 内会生长。当培养杜克雷嗜血杆菌和埃及嗜血杆菌时，培养时间应延长至 5 天，以保证这类苛养菌有足够的生长时间。此外，当技术人员欲培养杜克雷嗜血杆菌时，培养皿应置于 30～33℃的稍低温度和含有 5%CO_2 的高湿度环境中培养，因为同 35～37℃的孵育温度相比，较低的孵育温度有利于杜克雷嗜血杆菌的分离培养。

(二)菌落特征

通常在适合生长的培养基上培养 48 h 后，嗜血杆菌呈无色或浅黄色、平坦或凸起、直径为 0.5～2.0 mm 的菌落，某些特殊的嗜血杆菌可产生 β-溶血(表 38-1)。

流感嗜血杆菌在巧克力培养基上呈光滑或粗糙、凸起、浅灰色、半透明菌落，有荚膜的菌株通常呈黏液样，而无荚膜的细菌菌落更小，呈浅黄色(图 38-3)。大部分流感嗜血杆菌可产生吲哚，从而散发出很浓的胺样气味，不产生吲哚的菌株则散发出“鼠穴样”气味。流感嗜血杆菌经 24 h 孵育后可形成直径为 1～2 mm 菌落。生长在透明培养基，如 Levinthal 琼脂上的菌落，在折向透射光照射下显示虹彩[70-71]。新鲜菌落虹彩最明显，当菌落老化时颜色消失。虹彩的颜色可包括黄色、红色、绿色或蓝色，b 型流感嗜血杆菌菌落呈很明显的虹彩，而无荚膜的菌株则呈典型的蓝-绿色(图 38-4)。

埃及嗜血杆菌在培养 48 h 后菌落直径仅为 0.5 mm，呈粗糙、凸起、半透明，表面光滑。在半固体培养基(含有 0.4%琼脂，相对于含 1.5%琼脂的固体培养基)中呈“彗星状”菌落特征[4,41]。

副流感嗜血杆菌呈典型的灰白色至黄色菌落，和流感嗜血杆菌一样，在孵育 24 h 后菌落直径可达 1～2 mm。菌落特征变化多样，可呈平坦光滑、颗粒状锯齿边缘或堆积的皱褶菌落。最后还可以从琼脂表面完整挑起整个菌落。副流感嗜血杆菌随着菌落的成熟老化，形态也会改变。

溶血嗜血杆菌呈光滑、凸起的半透明菌落，在葡萄球菌周围不形成卫星现象。在培养 24 h 后菌落直径通常可达 0.5～1.5 mm，血琼脂上菌落周围可出现明显的 β-溶血，在培养基上连续传代培养后可失去溶血能力。副溶血嗜血杆菌和副溶血嗜沫嗜血杆菌的生长特性和菌落形态均与溶血嗜血杆菌类似。

无论使用何种培养基，杜克雷嗜血杆菌均生长缓慢，通常在培养 3～5 天后才生长，在巧克力琼脂上多呈细小、平整、光滑的灰白色菌落。较大的菌落通常散布于小菌落之间，但形态相同。杜克雷嗜血杆菌在血琼脂上生长不良，菌落周围可有轻微的 β-溶血。和副流感嗜血杆菌一样，成熟的杜克雷嗜血杆菌菌落黏着紧密，可以在琼脂上被推动。

七、鉴定

可以通过对 X 和 V 因子的生长需求、卟啉试验、溶血性检测(从血琼脂培养基观察生长菌落)、糖发酵试验、产吲哚试验、鸟氨酸脱羧酶试验、脲

酶试验、触酶和β-半乳糖苷酶试验对嗜血杆菌进行鉴定和生物型鉴别(表38-1)。X和V因子的生长需求和卟啉试验足以对特定嗜血杆菌种进行推测性鉴定。但是,最终种的鉴定还需要通过表中列举的其他表型特征进行判断(表38-1)。另外,16S rRNA基因测序或基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术也可以对这些细菌进行明确鉴定。

(一)X和V因子生长需求试验

嗜血杆菌属对X和V因子的生长需求试验是将0.5麦氏浓度的菌液用棉拭子均匀涂抹在100 mm含有胰蛋白酶的培养皿中,贴上X、V和X+V因子纸片或试纸条,在含有5%～7% CO_2的气体环境中,35℃孵育20～24 h。如果待检菌在纸片或试纸条周围生长,而在远离纸片处不生长,即卫星现象,从而可以判定待检菌生长需要哪种因子(图38-7)。胰蛋白酶大豆琼脂是嗜血杆菌进行X和V因子生长试验的首选培养基,其他培养基有可能出现错误的结果[76-77]。ThermoFisher公司生产的三维平板(嗜血杆菌属ID Ⅱ)或是四维平板(嗜血杆菌属ID Quad)可用于检测嗜血杆菌对X和V因子的生长需求。在进行试验时,须小心操作,避免将X因子混入培养物中,因为这将会把流感嗜血杆菌错误鉴定为副流感嗜血杆菌。

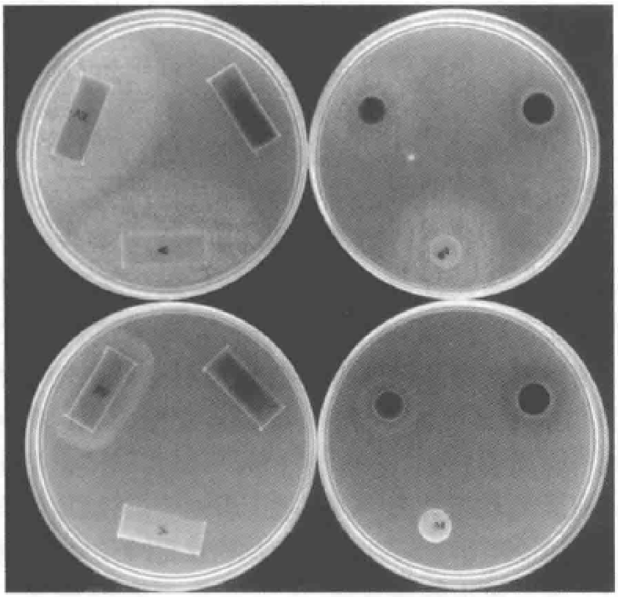


图38-7 X和V因子纸片法和试纸条卫星试验,左侧为流感嗜血杆菌,右侧为副流感嗜血杆菌,见彩插

所有需要X因子的嗜血杆菌,尤其是流感嗜血杆菌,缺乏一种必要的将δ-氨基乙酰丙酸(ALA)转化为原卟啉的酶,而原卟啉是X因子生物合成过程中的代谢中间体[78]。因此,需要人为添加X因子才能保证嗜血杆菌的生长。利用此特性,卟啉试验或ALA试验可作为一种检测方法以快速检测待检菌对X因子的需求情况[79]。当卟啉试验结果呈阳性时,表明待检菌是X因子非依赖性的;当结果为阴性时,表明待检菌生长需要X因子。由于临床实验室中绝大多数需要X因子的嗜血杆菌都是流感嗜血杆菌,当对临床分离株进行卟啉试验并发现结果呈阴性时,极有可能为流感嗜血杆菌。

卟啉试验可以使用商业化的ALA检测纸片或者制备液体的卟啉培养基[79]。液体卟啉培养基的制备是用pH 6.9的0.1 mol/L PBS配制的含2 mmol/L氨基乙酰丙酸和0.8 mmol/L $MgSO_4$溶液,然后每管分装0.5 ml,置4℃保存数月或-20℃保存数年。取一接种环的新鲜待检菌接种至试管中,置于35℃空气环境中孵育4 h[1]。孵育后,用能发出波长360 nm紫外光的设备如Wood灯检测砖红色荧光(图38-8),对于可疑的检测管可以继续孵育至24 h。或在液体卟啉培养基中加入0.5 ml Kovács试剂,摇动小管后在下部水相观察红色[1]。试验时应同时用不含氨基乙酰丙酸的卟啉培养基作为阴性对照,以避免由于吲哚产生所导致的假阳性反应。多项研究证实,卟啉试验

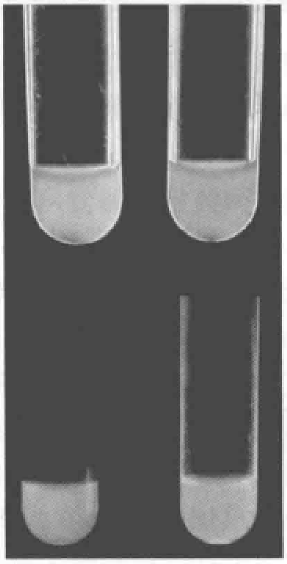


图38-8 卟啉试验结果,上层为阳性,下层为阴性,见彩插

在区分流感嗜血杆菌和非流感嗜血杆菌上优于因子生长需求试验[80]。

(二)传统生化反应

表38-1所示的是嗜血杆菌种间鉴定所需的生化反应。糖类的发酵试验需要在含有1%糖类且添加了10 μg/ml烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)和氯化血红素的酚红肉汤中进行。大量接种细菌以后,发酵管于35℃非CO_2环境下至多孵育1周,其间观察肉汤,若由红变黄即为阳性。通常在孵育24 h内即可出现阳性结果,但是埃及嗜血杆菌和惰性凝聚杆菌(*A. segnis*)孵育24 h只呈现弱阳性[1]。

通过斑点吲哚试验,大部分流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌菌株都能检测到产吲哚。然而,其他嗜血杆菌产吲哚的可靠评估,需要使用pH 6.8的含有0.1%L-色氨酸的0.067 mol/L磷酸盐缓冲液。接种后,将细菌悬液放置于35 ℃普通大气环境下孵育4 h后,加入0.5 ml Kovács试剂并且震荡混匀,检查试管上部是否出现指示阳性反应的红色[1,4](图38-9)。

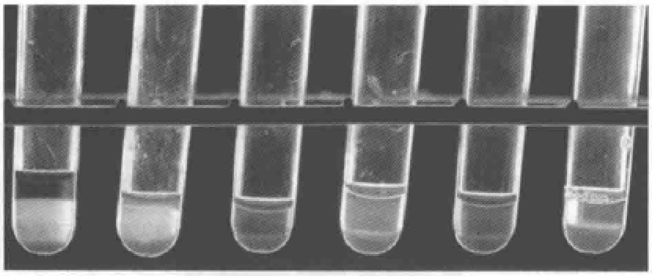


图38-9 嗜血杆菌属传统生化反应结果:从左至右,依次是吲哚、脲酶、鸟氨酸脱羧酶的阳性和阴性反应,见彩插

鸟氨酸脱羧酶的检测需使用鸟氨酸脱羧酶培养基(见第20章)或Moeller培养基。含有2种培养基之一的生化管,接种大量细菌以后,于35℃空气环境下孵育4~24 h,出现紫色则表示细菌产鸟氨酸脱羧酶[1,4](图38-9)。鸟氨酸脱羧酶阳性的嗜血杆菌包括流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌的几种生物型。

如同吲哚生成试验一样,在大多数情况下,脲酶斑点试验可用于有效地检测大多数流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌产生的脲酶。检测其他菌种脲酶的产生需要脲酶培养基:0.1 g KH_2PO_4、0.1 g K_2HPO_4、0.5 g氧化钠和0.5 ml酚红(1∶500)溶于100 ml蒸馏水,用NaOH将pH调节至7.0,并加入10.4 ml含20%尿素的水溶液。接种细菌后,生化管于35℃空气环境下孵育4 h,出现粉红到深红的颜色,表明阳性反应[1,4](图38-9)。

(三)商品化的生化鉴定系统

数种嗜血杆菌商品化的鉴定系统已经问世。这些系统是由一系列常规生化试验组合而成,经常是微量的,检测时间明显短于常规生化检验。这些商品化鉴定系统的性能特点和鉴定准确性变化极大[72,76,80-81]。ThermoFisher公司的RapID NH鉴定系统在微孔中集成了11种用于鉴定嗜血杆菌的生化反应。该试剂盒采用磷酸盐水解和硝酸盐还原反应来鉴定菌株是否属于嗜血杆菌属,其余的试验用于种的鉴定和流感嗜血杆菌生物型的确定。

BBL Crystal奈瑟菌/嗜血杆菌ID系统(BD)和API NH试剂盒(bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)在微孔板中提供微量生化反应鉴定,在5 h之内可获得结果。Crystal鉴定卡集成了29种不同的生长底物,在孵育5 h后通过检测这些底物转变为有色产物和荧光产物的量来判断。API NH试剂盒由12种脱水底物和1个用于检测青霉素酶的微孔所组成,可以用于嗜血杆菌属、奈瑟菌属及莫拉菌属(*Moraxella* spp.)的鉴定。除了上述2种手工检测平台,已经开发了一个仪器的鉴定系统,可用于嗜血杆菌鉴定,即VITEK 2仪器(bioMérieux)配套的奈瑟菌-嗜血杆菌鉴定卡。该鉴定卡的数据库可鉴定27个分类群细菌,其中包括奈瑟菌属、嗜血杆菌属、放线菌属(*Actinobacillus*)、弯曲菌属(*Campylobacter*)、二氧化碳嗜纤维菌属(*Capnocytophaga*)、心杆菌属(*Cardiobacterium*)、艾肯菌属(*Eikenella*)、加德纳菌属(*Gardnerella*)、金氏杆菌属(*Kingella*)、莫拉菌属、寡源杆菌属(*Oligella*)及萨顿菌属(*Suttonella*)。通过使用具有典型特征的保存菌株和临床分离菌株对VITEK 2系统进行评价,发现鉴定准确率因菌种的不同而有差异,总体为90%~95%[81-82]。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)的应用提高了鉴定的准确性,很大程度上使卡片鉴定成为备选方法。

(四)质谱分析

Bruker MALDI Biotyper (Bruker Daltonics,

Billerica,MA)和 VITEK MS (bioMerieux)2 种商用 MALDI-TOF MS 系统,目前在美国 FDA 批准的数据库中已包括流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌,并在 RUO 数据库中增加了其他几种菌株。FDA 批准的数据库中 VITEK MS 包括副溶血嗜血杆菌,而 Bruker MALDI Biotyper 包括溶血嗜血杆菌和副溶血嗜血杆菌群,后者包括副溶血嗜血杆菌和副溶血嗜沫嗜血杆菌,但无法区分到种。对基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)早期版本的评价研究表明该技术对包括嗜血杆菌属在内的 HACEK 组微生物鉴定的优越性能[83-84]。Couturier 等[83]的研究表明,使用 Bruker MALDI Biotyper v2.0 版能将 90%的副流感嗜血杆菌和 98%的流感嗜血杆菌鉴定到种的水平。同样地,van Veen 等[84]也证实能将 98%以上的 HACEK 细菌鉴定到种的水平。Branda 等[85]近期评价了 VITEK MS IVD(bioMérieux),发现 96%的流感嗜血杆菌和 92%的副流感嗜血杆菌能正确鉴定到种。Powell 等[134]评估了 VITEK MS 系统对流感嗜血杆菌($n=26$)、副流感嗜血杆菌($n=20$)、溶血嗜血杆菌($n=11$)和副溶血嗜血杆菌($n=6$)的鉴定效果。所有流感嗜血杆菌和副溶血嗜血杆菌分离株均可以正确地鉴定到种水平,而只有 90%的副流感嗜血杆菌分离株可以被正确鉴定。所有溶血嗜血杆菌分离株都被错误地鉴定为流感嗜血杆菌,但是该作者注意到是因为用于评价的 VITEK MS 数据库中缺少溶血嗜血杆菌对应的谱图。

将 Bruker MALDI 与 VITEK MS 进行比较的研究较少;然而,Frickmann 等[86]在流感嗜血杆菌、副流感嗜血杆菌、副溶血嗜血杆菌鉴定方面将 VITEK MS RUO(bioMérieux)生物分型鉴定和荧光原位杂交进行了比较。使用甲酸提取法,VITEK MS(译者注:此处应为 Bruker MALDI-TOF MS)能将 100%的流感嗜血杆菌(50/50)、88%的副流感嗜血杆菌(22/25)和 100%的副溶血嗜血杆菌(2/2)鉴定到种的水平。该作者发现,如果不预先使用甲酸提取,鉴定准确率并没有显著差异(尽管副流感嗜血杆菌的鉴定率下降到 72%,且有一株副溶血嗜血杆菌未能鉴定)。VITEK MS RUO 能鉴定 82%的流感嗜血杆菌(41/50)、68%的副流感嗜血杆菌(17/25)、50% 的副溶血嗜血杆菌(1/2),所有这些鉴定均未使用甲酸提取法[86]。这 2 个鉴定系统对 7 株溶血嗜血杆菌均未能鉴定[86],这可能是由于在数据库中细菌不具有代表性。Martiny 等[87]比较了 VITEK MS IVD 与 Biotyper IVD 的性能,发现这 2 个系统对流感嗜血杆菌的鉴定率均达到 100% ($n=30$)。在此项研究中,因为缺乏除流感嗜血杆菌以外的其他细菌,使评价较为局限[87]。

除了以上介绍的研究以外,MALDI-TOF 对嗜血杆菌的分型性能尚未进行评价,进一步的研究已获得批准。一项研究讨论了 Bruker MALDI Biotyper 在 Hib 和非 Hib 分离株荚膜分型中的应用[88]。该作者将具有遗传多样性 Hib 分离株($n=19$)和非 Hib 分离株($n=10$)(译者按:原文此处 Hib 分离株为 33 株,非 Hib 分离株为 77 株)的初始样本集合分成 4 种不同的分类方法。最佳模型正确地鉴定了所有 Hib 分离株($n=33$)和 98.7%的非 Hib 分离株(76/77),而且该作者还论证了此结果在另一台 Bruker MALDI Biotyper 仪器上的重复率为 98%[88]。

(五)分子鉴定

对分离培养的嗜血杆菌菌种进行鉴定,在文献中提到过几种分子生物学方法,包括 16S rRNA 基因测序、二代测序、PCR、微矩阵和荧光原位杂交等,均是有效的鉴定工具[50,89-91]。

鉴定和鉴别嗜血杆菌的分子靶点很多。前期研究表明,可以使用 *cap* 位点(其含有荚膜 *bexA*)[52,62,92-93]、16S rRNA 基因[50,62,94-95]、插入样序列(*IS*1016)[93]、延胡索酸还原酶铁硫基因 B(*frdB*)[96]、锰依赖的超氧化物歧化酶(*sodA*)[97]及外膜蛋白 P6 基因(*ompP6*)[62,94,98]来进行流感嗜血杆菌的检测。这些靶点可与 PCR(实时或传统)、微矩阵或测序技术结合来鉴定细菌。广泛使用测序、16SrRNA 分析,能将菌株鉴定到种的水平。但是对流感嗜血杆菌、埃及嗜血杆菌及流感嗜血杆菌生物型间的鉴定却产生了问题,因为它们之间有高度的同源性。在这种情况下,可以采用引入其他的靶分子,如 *rpoD*,或使用测序联合生化反应来进行鉴定。

使用高通量感染病检测组合,如 FilmArray (BioFire Diagnostics,Salt Lake City,UT)或 Verigene(Nanosphere,Inc.,Northbrook,IL)检测阳性血培养,能减少住院时间并加强抗生素的管

理[99]。应用这些技术从血培养阳性标本中鉴定嗜血杆菌能显著缩短鉴定时间。关于 FilmArray 平台的临床数据有限，但在一项大型多中心研究中，所有 8 个流感嗜血杆菌分离株均被正确鉴定，没有观察到假阳性结果[100]。

在一项研究中，二代测序技术已应用于嗜血杆菌鉴定，无须预培养。在 Salipante 等[101]的研究中，该作者对 66 例囊性纤维化患者的痰标本进行深度序列分析，并在 5 份标本中鉴定出了流感嗜血杆菌。该 5 份阳性标本中，有 4 份仅能通过测序得以鉴定，而另一份只能通过培养检出[101]。培养和测序结果的差异说明两者之间的一致性尚存质疑。培养出细菌无疑表明确实存在活的细菌，而测序检出 DNA 也许代表患者仍然处在感染过程中，也可能表示患者有既往感染遗留的 DNA。努力解决这个矛盾是很重要的，因为虽然测序并不适用于所有实验室，但每份样本的试剂成本已低于 75 美元，使测序已经快速成为常规临床微生物实验室能够负担得起的项目[101]。

(六)鉴定中存在的问题

对于流感嗜血杆菌、埃及嗜血杆菌及流感嗜血杆菌埃及生物型的鉴定，最大的挑战是彼此间缺少生化反应及基因序列的差异[1,4,6]。生化反应谱以及标准 16S rRNA 基因测序，并不足以区分这些细菌[1,4,6]，故有必要使用另一种测序位点，如那些在前文中提到过的靶点，或必须将生化反应与测序联合应用。不能准确鉴别细菌是有问题的，因为埃及嗜血杆菌不引起巴西紫癜热，而流感嗜血杆菌埃及生物型却能引起该病。根据大多数流感嗜血杆菌能发酵木糖、流感嗜血杆菌埃及生物型生长缓慢，以及埃及嗜血杆菌能凝集人类红细胞等特征对鉴别这些细菌或许有价值[1,6]。

八、分型系统

(一)荚膜血清分型和生物分型

流感嗜血杆菌的荚膜抗原是其主要的毒力因子。已经确认了 6 种不同的荚膜抗原，根据每种抗原的碳水化合物组成不同，冠以字母 a～f 命名。在引进小儿 HIB 疫苗之前，从人类的临床标本中最常分离到的是荚膜抗原 b 型菌株。但是，目前至少在那些广泛使用 b 型流感嗜血杆菌疫苗的人群中，非 b 型的菌株出现的概率几乎与 b 型菌株相等。因此，了解临床标本中分离的流感嗜血杆菌菌株荚膜血清型也许更有意义，尤其是那些引起侵袭性疾病的菌株。可以通过使用表型和基因型方法完成。

流感嗜血杆菌的荚膜血清分型试验最成熟的方法是玻片凝集反应，该方法需要 6 种分别与每个荚膜抗原能发生特异性反应的多克隆抗血清[4,102-103]。建议分离流感嗜血杆菌后尽快进行血清型分析，因为随着时间的延长，荚膜抗原的量会逐渐下降，尤其是反复传代培养的菌株。或将型特异性抗体直接或间接标记上荧光分子，可以通过荧光显微镜检测抗体与同源荚膜抗原的结合[104-105]。这项技术切实可行，然而却没有商品化的试剂。

如上所述，基于产生吲哚、鸟氨酸脱羧酶、脲酶 3 个表型特征，可以将流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌分为多个不同的生物型(表 38-2)。此外，如前所述，至少流感嗜血杆菌的某些生物型与一些特定的疾病相关。

(二)分子方法分型

分子生物学的方法具有提高敏感性和特异性的优势[106]，这是因为该方法可以标准化且没有玻片凝集试验中对无荚膜菌株的假阳性反应。

流感嗜血杆菌的荚膜分型可以通过不同的分子方法进行。大多数这些分类方法依赖于扩增 *cap* 基因座内的基因、外膜蛋白 D 基因(*glpQ*)、荚膜生成基因(*bexA*)、16S rRNA 基因和插入样序列[107]。检测法则如下：*cap* 基因检测用来确定 a～f 的荚膜血清型，而荚膜生成基因 *bexA* 则用于区分产荚膜和不产荚膜的菌株[107]，*ompP2*(外膜脂蛋白 P2)基因检测作为质控。利用这个体系，对流感嗜血杆菌进行血清学分型，发现常规 NAAT 和实时 PCR 分析比玻片凝集试验更敏感[107]。

和肠杆菌科细菌(Enterobacteriaceae)一样，脉冲场凝胶电泳(PFGE)被认为是嗜血杆菌分型的“金标准”，最近被全基因组测序(WGS)取代。该方法能较好地区分各个克隆，但是耗时费力[108-110]。其他分子分型方法也已应用于嗜血杆菌。基于使用基因间配对序列(IDS)的特异性引物进行重复元件序列的 PCR(IDS-PCR)检测，已应用于无荚膜嗜血杆菌，并显示能较好地区分未

分型流感嗜血杆菌菌株[109]。应用于嗜血杆菌的具有高区分度的其他分型技术，包括核糖体分型、限制性片段长度多态性分析、多位点酶电泳分析、随机扩增多态性 DNA 分析及多位点序列分型(MLST)[109]。多位点序列分型具有最佳的分型能力，因为它综合了 7 个管家基因的序列分型结果，易于各实验室之间对比[6]。截至 2017 年底，公开的嗜血杆菌多位点序列分型数据库包含 3426 个序列和 1842 篇报道（https://pubmlst.org/hinfluenzae/）。经典的多位点序列分型(MLST)通过对基因的一小部分片段进行分析，可作为反映细菌间多样性的通用标准化系统。但是，经典的基于多位点序列分型的方法在同一克隆群中的区分度不够，不能满足流行病学的需要。全基因组分析可提供更加完整的信息，得以重建种系发生并进行菌株之间的比较。当应用到多位点序列分型方法时，分析的单位是单个等位基因，这可以通过多种方式扩展到全基因组数据。

全基因组测序能将微生物鉴定、抗生素耐药基因、微生物分型在一次分析中同时完成，并且测序及序列分析时间将缩短至 24 h 以内，用于暴发流行的实时检测将会变成处置标准。Power 等[111]最近进行了一项调查研究，对 85 株流感嗜血杆菌基因组进行了测序并使用 Mauve 软件进行序列比对。这项研究表明，菌株分类与血清型及序列中显著差异片段有关，这种差异主要由于基因转化所致。该研究初步显示，基于基因序列分型，可显著提高工作人员进行菌株分型的能力，走向更精确菌株序列分型[111]。为了支持使用全基因组测序对菌株分型，De Chiara[112]等对英国菌株收集库中的 97 株分离株进行了测序，发现了与局部 NTHi 感染相关的独特进化支，支持克隆进化的大多数遗传信息在谱系内垂直传播。这一观点得到了澳大利亚全基因组-多位点序列分型研究结果的支持，该研究发现具有荚膜的分离株大部分是同一克隆；然而，通过多位点序列分型和单核苷酸多态性分型，NTHi 分离株表现出较高的遗传变异性，未见优势克隆[113]。Mansson[114]等直接利用全基因组测序研究瑞典流感嗜血杆菌 ST14CC-PBP3IIb/A 株的克隆传播，评估了 2010—2012 年来源于呼吸道或侵袭性感染分离株的 3262 个基因组序列。他们发现隶属于 ST14CC 菌株的分离株占分离出的 NTHi 菌株的 26%，并且与未发生 *PBP3* 突变的菌株相比，感染这些菌株的患者住院率更高。菌株类型与以证明耐 β-内酰胺菌株(PBP3IIb/A)的动态传播区域的患者地址是重叠的。随着可用的基因组序列的数量不断增加，越来越多的临床和公共卫生实验室采用了全基因组测序，随着生物信息工具的改进和全基因组测序的自动化，传统的分型系统可能会被基于基因组的方法取代。

Harrison 等[106]全面综述了目前能用于嗜血杆菌分型的方法。嗜血杆菌使用多位点序列分型的文献完整列表可以在 https://pubmlst.org/hparasuis/references.shtml 找到。

九、血清学试验

已有抗体试验可用于检测嗜血杆菌抗体，然而并没有什么临床价值，也不易获得。酶联免疫吸附试验[115]与免疫荧光检测的评价研究结果已发表[116]。由于对嗜血杆菌的免疫反应源于抗体与嗜血杆菌荚膜及膜蛋白的选择性结合，故检测单一种类抗体的试验几乎没有价值。由于抗体水平（很多成人的抗体水平难以检测）、亲和力、持续时间的个体差异，使得嗜血杆菌血清学试验的应用进一步复杂化[16]。

十、抗菌药物敏感性

（一）耐药率

流感嗜血杆菌能产生 TEM-1 型或 ROB-1 型 β-内酰胺酶。这 2 种酶都是质粒介导的，能分泌到细胞外，且能持续大量产生[117]。产 β-内酰胺酶的菌株对氨苄西林和阿莫西林耐药，这些药物对这些菌株通常 MIC≥128 μg/ml[118-119]。

20 世纪 90 年代，在美国产 β-内酰胺酶的未分型流感嗜血杆菌的流行趋势下降，可能是因为在 90 年代初，非 β-内酰胺类抗菌药物（如大环内酯类和氟喹诺酮类）用于经验性治疗中耳炎、鼻窦炎、支气管肺炎的使用量增加，而这些感染通常是由未分型流感嗜血杆菌引起的[120]。这种治疗模式的改变，使得 β-内酰胺类抗生素（如氨苄西林和阿莫西林）的应用减少，从而降低了产 β-内酰胺酶的未分型流感嗜血杆菌出现

和生存的选择压力，使产β-内酰胺酶的未分型流感嗜血杆菌比率呈下降趋势。但看似矛盾的是，在过去10年里，这个趋势发生了变化，可能是由于儿科广泛应用肺炎链球菌偶联抗原疫苗的结果。由于肺炎链球菌已经不是急性中耳炎的常见病因，未分型流感嗜血杆菌重新成为了感染最常见的原因，同时β-内酰胺酶介导的氨苄西林耐药率也相应上升[121]。

β-内酰胺酶阳性的流感嗜血杆菌对口服及注射的头孢菌素类和碳青霉烯类抗生素敏感[118,120]。它们同样对含有β-内酰胺酶抑制药的复合剂敏感，如克拉维酸、舒巴坦或他唑巴坦与β-内酰胺类抗生素复合[118,120]。这些药物有阿莫西林/克拉维酸、氨苄西林/舒巴坦及哌拉西林/他唑巴坦。

已有报道发现有些流感嗜血杆菌菌株并不产生β-内酰胺酶，但它们对氨苄西林和阿莫西林的MIC值在升高[122]。这些菌株，通常被称为β-内酰胺酶阴性的氨苄西林耐药株(BLNAR)，它们是因为青霉素结合蛋白改变，使得氨苄西林和阿莫西林无法与细菌细胞壁上的作用靶点结合，进而使MIC值升高[123-124]。对于这些菌株头孢菌素的抗菌活性也有所下降。如果像CLSI[125]推荐的那样，将氨苄西林或阿莫西林对嗜血杆菌MIC≥4 μg/ml定义为耐药，那么在美国流感嗜血杆菌BLNAR的流行率为<1%[126-127]。但是在日本(2004年为34.5%)[128]和欧洲(2002－2003年为9.6%)[129]则呈现出流感嗜血杆菌BLNAR高流行率。

治疗嗜血杆菌感染的其他抗菌药物，除甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(TMP-SMX)外，耐药率均<1%[126-127]。这些抗菌药物包括口服或注射用的头孢菌素类、大环内酯类、氟喹诺酮类和四环素类。TMP-SMX耐药率接近30%[126-127]。目前在美国，约27%的未分型流感嗜血杆菌临床分离株产β-内酰胺酶[130]。

(二)药敏试验方法

嗜血杆菌产生的β-内酰胺酶，可以通过头孢菌素斑点显色试验或青霉素酶酸滴定试验进行快速检测，在本书第75章已有阐述。因为流感嗜血杆菌产生的β-内酰胺酶可以分泌到胞外，连续并大量产生，如果仔细进行测验并且有恰当的阳性和阴性对照，2种检测方法均可获得可靠结果。

进行琼脂扩散法药物敏感试验，按照CLSI介绍的[132]，可以使用嗜血杆菌药敏培养基(HTM)[131]，孵育条件为5% CO_2、35℃条件下孵育16～18 h，CLSI[125]已为43种不同抗生素建立了针对流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌的抑菌圈直径解释标准[125]。欧洲抗菌药物敏感性试验委员会(EUCAST)制定了纸片扩散法敏感性试验的标准，使用添加20 mg/L β-NAD的含5%去纤维马血MH(Mueller-Hinton)琼脂，在35℃、5% CO_2中孵育(18 ± 2) h(http://eucast.org/clinical_breakpoints/)。EUCAST已为24种不同抗生素建立了针对流感嗜血杆菌的抑菌圈直径解释标准(http://eucast.org/clinical_breakpoints/)。琼脂扩散法药敏试验的详细操作见第73章。

使用微量肉汤稀释法(BMD)能检测嗜血杆菌的MIC值。如果使用微量肉汤稀释法检测MIC值，CLSI提倡使用HTM肉汤[133]。接种细菌以后，肉汤管在35℃空气环境中孵育20～24 h后，再检测MIC值；CLSI已为45种不同抗生素建立了适用于流感嗜血杆菌和副流感嗜血杆菌的MIC解释标准[125]。EUCAST制定的MIC敏感性测试标准使用添加20 mg/L β-NAD的5%含裂解马血MH肉汤，用密封板在35℃下孵育(18 ± 2) h。EUCAST针对26种不同抗生素建立了仅针对流感嗜血杆菌分离株的MIC解释标准。微量肉汤稀释法的MIC试验详见第73章。遗憾的是，尚未有发表的数据支持使用Etest条检测嗜血杆菌的药敏，故并不推荐使用该方法对此菌属进行药敏试验。

临床分离得到的杜克雷嗜血杆菌的药敏测试不应该在常规的临床微生物实验室中进行，因为针对该菌已验证的具有可靠性能的标准药敏试验方法尚未建立。同样地，用于其他嗜血杆菌的药敏试验(包括流感嗜血杆菌)的仪器检测方法也尚未被证明是有效，不推荐用于检测该群细菌。

无论使用何种嗜血杆菌药敏试验方法，使用2株流感嗜血杆菌质控菌株ATCC49247和ATCC49766进行恰当的质量控制是必不可少的。

(三)药敏试验规则

嗜血杆菌临床分离株的药敏试验，应该只对确定具有临床意义的菌株进行。另外，在绝大多

数情况下，评价氨苄西林和阿莫西林的活性仅需要进行β-内酰胺酶试验。BLNAR菌株在流感嗜血杆菌中的发生率较低，并且它们对治疗嗜血杆菌相关感染的其他常用药物的耐药性极低，因而不需要进行日常的药敏试验。甲氧苄啶-磺胺甲噁唑耐药可能是一个例外，该药几乎是治疗社区获得性呼吸道感染唯一的口服药物，通常在没有对患者感染的具体病原菌进行实验室检查的情况下用于经验性治疗。换句话说，在一些医院，如果能对患者分离的菌株进行实验室检测，则获得的甲氧苄啶-磺胺甲噁唑抗流感嗜血杆菌的活性谱是有价值的，但是这种情况少之又少。在这些情况下，除氨苄西林或阿莫西林以外，使用纸片扩散法或者微量肉汤稀释的MIC法检测其他抗生素的活性是可靠的。

十一、结果的评价、解释和报告

嗜血杆菌属是一类变化多样的微生物菌群，可以作为健康人的正常菌群存在，也可能与一些重要的疾病相关。故单纯从临床标本中分离出嗜血杆菌，并不一定表明有临床意义。以下3种情况下，表明实验室中分离的嗜血杆菌可能是致病菌：①菌株来源于无菌部位，包括血培养，并有疾病相关的临床表现；②从生殖道溃疡患者的生殖道标本中分离的杜克雷嗜血杆菌；③从结膜炎患者的结膜标本中分离的埃及嗜血杆菌。

在可能被正常菌群污染的标本中分离到嗜血杆菌时，必须分析分离株的临床意义。该情况很多，如从呼吸道分离的菌株，其绝对量和该菌株与从标本中分离得到的其他微生物的相对量都对评估临床意义有参考价值。标本质量的评估（如咳出的痰及气管内抽吸液）对临床意义的判断也许会有帮助。将患者同一部位之前及后续的培养结果进行比较也可能有助于判断。总体来说，在同一个患者感染的不同阶段的多个标本中反复分离到相同的细菌提示具有临床意义。最后，必须认识到，在某些情况确定分离的嗜血杆菌是否具有临床意义是很困难的，在这些情况下应该积极与临床医生进行沟通和交流。

嗜血杆菌属是一种变化多样的微生物菌群，既可在人体内定植，也可引起从中耳炎到败血症的各种感染。使用适当的增菌培养基和新一代鉴定分型技术有助于临床医生更好地了解流行病学并对患者进行早期合理的管理。

参考文献请扫二维码查阅

第39章　埃希菌属、志贺菌属和沙门菌属

BLAKE W. BUCHAN，MATTHEW L. FARON，ROMNEY M. HUMPHRIES，
JOHN DEKKER，NATHAN A. LEDEBOER

（刘泽世　译；杜鸿、马筱玲　审校）

埃希菌属、志贺菌属和沙门菌属细菌通常引起胃肠道和泌尿道感染，也可引起败血症和脑膜炎等较严重的感染。本章从流行病学、分类学、毒力等方面对每个菌属进行概述，并讨论了鉴定和分类的方法，包括培养法和非培养法。最后，讨论了细菌耐药的最新趋势，阐明目前治疗活动性感染的最佳方案。

一、埃希菌属

（一）分类学

目前，肠杆菌目分为7个不同的科，包括肠杆菌科、欧文菌科、哈夫尼亚菌科、耶尔森菌科、果胶杆菌科、摩根菌科和布戴维采菌科。埃希菌属（*Escherichia*）细菌隶属于肠杆菌科，模式菌种为大肠埃希菌，于1884年在新生儿肠道菌群的研究中首次被发现。埃希菌属的其他5个菌种为：弗格森埃希菌（*Escherichia fergusonii*）、伤口埃希菌（*Escherichia vulneris*）、赫氏埃希菌（*Escherichia hermannii*）、蟑螂埃希菌（*Escherichia blattae*），以及最近确认的阿尔伯蒂埃希菌（*Escherichia albertii*）[1-2]。过去，通常根据表型特征进行属间及种间的鉴定，包括生化反应和物理特性，如运动性和菌落色素沉着。但由于菌种间的相似性，仅依靠生化反应进行分析，会导致菌种系统发育和鉴定不准确[1,3]。

DNA-DNA杂交、G+C含量分析和核酸序列分析等分子技术有助于更加准确地研究系统发育。大肠埃希菌的G+C含量范围较小，为48%～52%，与沙门菌属、志贺菌属及欧文菌属相似[4-5]。埃希菌属细菌的基因组大小为4.5～5.7 Mbp，包含4157到5315个基因[6]。有趣的是，只有6%的基因同时存在于每个已测序的基因组中，表明该菌属存在显著的基因多样性。16S rRNA基因序列分析是常用的细菌鉴定方法，但该基因在埃希菌属细菌中非常保守，无法用于种间鉴定[6-7]。

检测细菌染色体较大区域的其他方法，如DNA-DNA杂交，可以很好地进行种间鉴定。菌株之间的核酸关联＞70%则被定义为同一菌种[8]。人类和动物来源的大肠埃希菌不同菌株之间的关联值为85%～99%[4]。在埃希菌属中，大肠埃希菌和弗格森埃希菌的关联值最高（60%～65%），而大肠埃希菌与赫氏埃希菌、伤口埃希菌、蟑螂埃希菌的关联性为29%～45%[2,9]。最近的核酸分析将蟑螂埃希菌重新分类归入蟑螂西姆惠菌（*Shimwellia blattae*）[10]。鲍氏志贺菌（*Shigella boydii*）、痢疾志贺菌（*Shigella dysenteriae*）、福氏志贺菌（*Shigella flexneri*）和宋内志贺菌（*Shigella sonnei*）与大肠埃希菌的关联性为80%～89%，表示这些菌属之间分类关系紧密，而其他菌属与大肠埃希菌的核酸关联不超过50%，通常＜40%[4,11]。

当采用核酸测序的鉴定方法时，大肠埃希菌和志贺菌属间仍显示有十分紧密的分类关系。靶向和全基因组序列分析表明，大肠埃希菌与志贺菌属之间的关系比其与其他埃希菌属间的关系更密切[6,12-14]。基于7个保守管家基因的系统发育研究发现，志贺菌属细菌簇均散布在大肠埃希菌不同血清型间，而其他埃希菌属细菌的亲缘关系较远[6]。最近基于高度保守基因 *tuf*（延伸因子Tu）和 *atpD*（F-ATP酶β亚基）的遗传分析进一步证实了大肠埃希菌、弗格森埃希菌和志贺菌属

之间的关系密切，但是赫氏埃希菌和伤口埃希菌在分类上更接近肠杆菌属[15]。

非致病性和致病性大肠埃希菌类型广泛、多样，促使人们对其进行分类学研究。根据7个管家基因的序列同源性，提出了5个主要的种系群(A、B1、B2、D和E)[12,14]。虽然种系群与致病性的相关性较弱，但总体来说，A种系群主要为共生菌，其他种系群主要为致病菌[13-14]。例如，从肠外感染分离出的大肠埃希菌菌株，72%～85%属于B2种系群[16]。分子系统发育学研究表明，肠侵袭性大肠埃希菌(enteroinvasive *E. coli*，EIEC)、肠出血性大肠埃希菌(enterohemorrhagic *E. coli*，EHEC)、肠致病性大肠埃希菌(enteropathogenic *E. coli*，EPEC)、K1血清型大肠埃希菌等特定的致病性大肠埃希菌(致病变种)独立地出现在多个种系群中[13-14]。这些数据表明，遗传多样性和毒力的主要驱动因素是基因的水平转移，而不是随机突变事件和选择压力[14]。基因或多基因盒的水平转移可使非致病性大肠埃希菌转化为特定的致病变种。例如，无论其谱系如何，编码热稳定型肠毒素(ST)和热不稳定型肠毒素(LT)基因的转移有可能将非致病性大肠埃希菌转化为肠毒素性大肠埃希菌(ETEC)[6,12]。由于获得了额外的毒力基因，所以致病性大肠埃希菌，如血清型O157 EHEC、致肾盂肾炎型大肠埃希菌(uropathogenic *E. coli*，UPEC)和EPEC的基因组比它们相应的共生菌的基因组约大1 Mb[6,17]。根据全基因组分析的系统进化树研究显示，大肠埃希菌致病变种间毒力相关基因的转移明显，且其致病变种共享特定的毒力基因或毒素簇聚集在一起，而与管家基因序列的相关性无关。无亲缘关系的致病变种大约有50%的基因组具有相似性，但致病变种间的差异由一小组特异性基因决定，范围从EHEC的120个到UPEC的45个，而EPEC和ETEC只有3～6个[17]。这些基因编码与发病机制相关的菌毛、毒素或分泌系统。EHEC分离株中致病变种的聚集最为明显，与痢疾志贺菌也密切簇聚。菌株和一个相对较小的“核心”染色体之间频繁的水平重组阻碍了该菌种的简单进化树的发展。

(二)属的描述

埃希菌属细菌为兼性厌氧、无芽胞的革兰阴性杆菌，长1～3 μm，直径0.5 μm，但其大小受温度、生长状态和抗生素的影响[18]。多个周鞭毛驱动其在液体培养基(游动)和半固体培养基(涌动)中运动。根据K抗原类型来鉴定大肠埃希菌的荚膜。这些菌株表现出血清抗性增加，并与肠道外感染相关。埃希菌属细菌在实验室常规培养基上生长良好，包括添加或不添加血液补充物的胰蛋白酶大豆琼脂、麦康凯琼脂(MacConkey，MAC)、胰蛋白酶大豆肉汤，以及实验室中常用的各种鉴别和选择性培养基(参见后文“分离程序”)。在35℃孵育18～24 h后出现圆形、光滑、凸起的灰色菌落，直径3～6 mm，部分菌株出现狭窄的β-溶血环。在生化方面，95%以上的大肠埃希菌可以发酵乳糖产酸产气，吲哚、赖氨酸脱羧酶和硝酸盐还原试验阳性，氧化酶、七叶苷和脲酶试验阴性(表39-1)。约有5%的大肠埃希菌生化反应不活泼，不发酵乳糖，吲哚及其他生化反应呈阴性，导致这些菌株很难根据生化反应与志贺菌区分，因而需要根据血清分型进一步鉴别。其他的埃希菌属细菌，如阿尔伯蒂埃希菌和弗格森埃希菌，与大肠埃希菌生化特征不同，所以如果仅依靠生化试验进行鉴定，将会导致鉴定困难或鉴定错误[1,19-20]。

(三)流行病学和传播

埃希菌属细菌是昆虫、鸟类和哺乳动物主要无症状定植菌。然而，一些菌种或菌株具有一系列的毒力因子，能引起胃肠道、泌尿道或其他肠道外疾病。该属细菌主要的传播途径是粪口传播，包括摄入粪便污染的食物或水间接传播。在与埃希菌属相关的人类疾病中，99%以上源于大肠埃希菌的各种致病变种。最常分离出兼性厌氧菌的哺乳动物的小肠和大肠，同样是大肠埃希菌主要的定植场所。由于易从粪便中分离培养，所以大肠埃希菌被认为是优势菌，但事实上，大肠埃希菌只占健康人群肠道微生物总数的0.1%或更少[21]。

从环境土壤和水中分离出大肠埃希菌可以作为粪便污染的指标[22]，被污染的土壤和水可成为致泻性致病变种的重要传染源。大肠埃希菌可在地表水中存活5～15天，在土壤或沉积物中可存活40天或更长[23]。在卫生条件差的南亚(印度)和东南亚的农业区，超过25%的饮用水源含有致泻性大肠埃希菌[23]。在这些地区，致病性大肠埃

表 39-1 6 种埃希菌和肠杆菌科某些细菌的生化反应[a]

物种/生物群	吲哚产生	乙酰甲基甲醇试验(VP试验)	动力(35℃)	黄色素	赖氨酸脱羧酶	鸟氨酸脱羧酶	氰化钾生长	醋酸利用	半乳糖二酸盐利用	D-葡萄糖,产气	核糖醇,产酸	L-阿拉伯糖,产酸	D-阿拉伯糖醇,产酸	纤维二糖,产酸	半乳糖醇,产酸	乳糖,产酸	蔗糖,产酸	D-甘露醇,产酸	棉子糖,产酸	L-鼠李糖,产酸	D-山梨(糖)醇,产酸	D-木糖
阿尔伯蒂埃希菌/生物群 1(*n*=5)(如,阿勃特 19982)	0	0	0	0	100	100	0	20	20	100	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
阿尔伯蒂埃希菌/生物群 2(*n*=10)(如,前鲍氏志贺菌 13 型)	100	0	0	0	0	100	0	0	0	40	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	100	0
蟑螂埃希菌	0	0	0	0	100	100	0	50	100	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100
大肠埃希菌	98	0	95	0	90	65	0	90	95	95	5	99	5	2	60	95	50	98	50	80	94	95
大肠埃希菌(不活跃生物型)	80	0	5	0	40	20	1	40	30	5	3	85	5	2	40	25	15	93	15	65	75	70
弗格森埃希菌	98	0	93	0	95	100	0	96	0	95	98	98	100	96	60	0	0	98	0	92	0	96
赫氏埃希菌	99	0	99	98	6	100	94	78	97	97	0	100	8	97	19	45	45	100	40	97	0	100
伤口埃希菌	0	0	100	50	85	0	15	30	78	97	0	100	0	100	0	15	8	100	99	93	1	100
鲍氏志贺菌[b]	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	94	0	0	12	1	0	99	0	1	59	27
痢疾志贺菌	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	45	0	0	4	0	0	0	0	30	29	3
福氏志贺菌	42	0	0	0	0	0	0	8	0	3	0	60	1	0	2	0	1	91	33	5	30	3
宋内志贺菌	0	0	0	0	0	98	0	0	10	0	0	95	0	5	0	2	1	99	3	77	1	1
蜂房哈夫尼亚菌	0	85	85	0	100	98	95	15	0	98	0	95	0	15	0	5	10	99	2	97	0	98
蜂房哈夫尼亚菌/生物群 1	0	70	0	0	100	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	55	0	0	0	0
沙门菌甲型副伤寒血清型	0	0	95	0	0	95	0	0	0	99	0	100	0	5	90	0	0	100	0	100	95	0
沙门菌猪霍乱血清型	0	0	95	0	95	100	0	1	0	95	0	0	1	0	5	0	0	98	1	100	90	98
鲁氏耶尔森菌	0	10	0	0	50	100	15	0	0	5	0	5	0	5	0	0	0	100	5	0	50	0

注:[a] 表中的数值是指,菌株在 35~37℃条件下孵育 1~2 天,测试结果为阳性的菌株数占受试菌株数的百分比。不考虑菌株 2 天后变成阳性的反应。编制数据来源于 Ewing 等[256]、Wathen-Grady 等[172,257]、Ansaruzzaman 等[258]、Pryamukhina 和 Khomenko[259]及 Farmer[260]发表的研究结果,以及疾病预防控制中心参比实验室未发表的调查结果(1972—2005 年)。[b] 不包括先前鉴定为鲍氏志贺菌 13 型

希菌是儿童感染性腹泻的第三或第四大病因,发病率为 1~2/100[24]。在美国,致泻性大肠埃希菌分离株的组合导致每年 20 万例以上感染性腹泻的发生。这些感染中的大多数(60%~80%)是食源性的,最常见的感染媒介是未煮熟的肉类,通常是在屠宰和加工过程中受到肠道内容物污染的牛肉。大肠埃希菌在受到土壤或水污染的新鲜水果或蔬菜中也能存活。腹泻性大肠埃希菌致病变种的感染剂量范围从 EHEC 的 10~100 CFU 到 EPEC 和肠集聚性大肠埃希菌(enteroaggregative *E. coli*,EAEC)的 $>10^6$ CFU[26]。

大肠埃希菌是孕妇尿路感染(urinary tract infections,UTI)的主要原因,占感染的 75%以上(美国每年约有 1000 万例感染)[27]。感染的主要来源是定植菌从胃肠道转移到尿道,然后上行到膀胱。非复杂性尿路感染的重要危险因素包括女性、频繁性交和泌尿道感染史[28]。女性终身患 UTI 的风险约为 50%,而男性终身患 UTI 的风险仅为 0.5%。导管相关性尿路感染(catheter-associated UTI,CAUTI)是最常见的医院获得性感染之一,占所有此类感染的 12%~17%[29]。与非复杂性 UTI 不同,大肠埃希菌仅占 CAUTI 的 12%~35%,而肠杆菌科的其他细菌、摩根菌科(Morganellaceae)变形杆菌属(*Proteus*)、假单胞菌属、肠球菌属和凝固酶阴性葡萄球菌属占感染的绝大部分[30-31]。重要的是,尽管引起 CAUTI 的

病例相对较少，但所有CAUTI相关菌血症病例中，大肠埃希菌占40%～70%[29]。值得注意的是，60%～80%留置导尿管的住院患者由于接受抗生素治疗，可筛选或形成高耐药株。以下部分更详细地介绍了特定大肠埃希菌致病变种所致疾病的表现、危险因素和流行病学描述。

目前，对大肠埃希菌外其他埃希菌属细菌的流行病学还不甚了解，这些菌种也是胃肠道的共生菌，但相比哺乳动物，它们更常见于鸟类或昆虫。阿尔伯蒂埃希菌是一种与人类急性肠胃炎相关的病原菌，最初在野生鸟类和家禽的粪便中被发现[3]。已在高达1.5%的供人食用的鸡肉中检出，并与孟加拉国腹泻疫情的暴发相关[32-33]。弗格森埃希菌常存在于无症状的鸡、火鸡、猪和其他家畜，但很少分离自人类[20]。

(四)临床意义

1. 除大肠埃希菌外其他埃希菌属细菌 除大肠埃希菌外，其他埃希菌在过去30～40年才被发现，而且很少引起人类感染。近年来，细菌鉴定方法不断发展，如基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)和PCR等技术的使用使人们能够识别这些菌种，并且提高了这些菌种在人类感染中的认识。

阿尔伯蒂埃希菌是与大肠埃希菌关系最为密切的埃希菌属细菌，具有54%～60%的遗传同源性。而无动力、不发酵乳糖及吲哚结果不确定等表型特征，使阿尔伯蒂埃希菌易于和大肠埃希菌进行区分，但很难区别于其他肠杆菌科细菌，如哈夫尼亚菌和志贺菌[34-35]。此外，细菌生化鉴定系统的数据库中可能不包括阿尔伯蒂埃希菌，或可能无法准确鉴定该菌种[1,34,36]。2项大型研究发现，根据基因特异性PCR和多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)，从腹泻粪便中分离出的肠致病性或肠出血性大肠埃希菌(EPEC或EHEC)实际上14%～19%是阿尔伯蒂埃希菌[34-35]。这些数据表明，以阿尔伯蒂埃希菌为肠道病原体的发病率可能被低估。所有阿尔伯蒂埃希菌分离株都编码紧密黏附蛋白(intimin protein)*eaeA*，该蛋白能够介导细菌与肠上皮的黏附[34-35]。此外，85%～96%的阿尔伯蒂埃希菌分离株含有*cdtB*基因，其编码一种在艰难梭菌(*C. difficile*)和EHEC中都发现的细胞致死膨胀毒素；4%～10%的阿尔伯蒂埃希菌含有EHEC特征性志贺样毒素基因*stx2f*[34,35,37]。携带*stx2*基因的分离株与严重的血性腹泻和溶血性尿毒症综合征(hemolytic-uremic syndrome, HUS)相关[37]。这些菌株可能是山梨醇阳性或阴性，可用乳胶凝集法或酶联免疫吸附试验检测志贺毒素[34-35]。阿尔伯蒂埃希菌主要与急性胃肠炎有关，包括几次食源性疾病的暴发，但很少从胃肠道以外的感染中分离出来[33,38]。

虽然有研究显示，在11%的潜在尿路感染患者的尿标本中，弗格森埃希菌培养阳性，但该菌很少被认为可引起人类严重感染[20,39]。在腹泻患者的粪便标本中也发现了弗格森埃希菌，但很少在血液和创伤感染中发现[20,40]。目前，已在部分弗格森埃希菌分离株中鉴定出致病性大肠埃希菌中编码ST、LT、紧密黏附素(*eaeA*)和菌毛基因的同源序列；但尚未有明确的突变研究确认这些基因的功能[20]。此外，高达47%的菌株不包含可识别的毒力相关基因。综上所述，当从非无菌部位分离出弗格森埃希菌时，上述因素使临床意义的解释复杂化。如果认为该菌有意义，就应进行药敏试验来指导治疗，因为已出现多重耐药的菌株，包括产超广谱β-内酰胺酶(ESBL)的菌株[20]。

赫氏埃希菌显示出一种特有的黄色色素，可将其与其他埃希菌属细菌区分[9]。该菌很少分离于临床标本，它通常与已确定的致病菌一起分离于多种细菌的创面培养物或其他非无菌标本(如粪便和痰)[9,41]。侵袭性感染的病例，包括肾盂肾炎、脑膜炎和血流感染(bloodstream infection, BSI)，仍极为罕见，且主要见于老年人或免疫功能受损者，包括糖尿病和恶性肿瘤[9,41-43]。赫氏埃希菌对青霉素、氨苄西林和阿莫西林耐药，但对头孢菌素类、碳青霉烯类和氟喹诺酮类药物敏感[9,42-43]。

伤口埃希菌与赫氏埃希菌具有相同的遗传特性和临床特征[44]。虽然在临床标本中很少发现，但74%的分离株从伤口中获得，10%从呼吸道中获得[44]，而赫氏埃希菌从未在纯培养中被分离，也未被证明是主要致病菌。此外，在小鼠腹腔感染模型中，赫氏埃希菌并不致死[44]。这些因素使人对非无菌部位分离的赫氏埃希菌的临床意义产生怀疑。已报道包括菌血症和脑膜炎的罕见侵袭性感染，其与免疫缺陷状态或留置医疗

器械有关[45-46]。此外，有1例婴儿急性胃肠炎继发菌血症的报道[45]。

在埃希菌属中，蟑螂埃希菌与大肠埃希菌的亲缘关系最远，并被重新归入志贺菌属。蟑螂埃希菌对人类没有致病性，通常从蟑螂的后肠中分离出来，是啤酒酵母的常见污染菌[10]。

2. 肠外致病性大肠埃希菌 大多数位于肠道内的大肠埃希菌都是非致病性菌株，但某些特异的大肠埃希菌菌群含有毒力因子，有助于在胃肠道外传播、持留或致病。综合起来，这些菌株被称为肠外致病性大肠埃希菌（extraintestinal pathogenic *E. coli*，ExPEC）。肠外致病性大肠埃希菌包含2种主要的致病群或致病变种，即UPEC和脑膜炎/脓毒症相关的大肠埃希菌（meningitis/sepsis-associated *E. coli*，MNEC）。这2种病原菌均含有相似的致病因子，主要存在于B2型大肠埃希菌系统群中。这些致病变种可在健康的宿主中引起感染，如非复杂UTI，但如留置导尿管、免疫缺陷状态及通过手术或创伤性损伤等使病原体转移到通常无菌的部位时会增加感染的可能性。在医院环境中，ExPEC是UTI的主要病因（52%），是血流感染和皮肤/软组织感染中仅次于金黄色葡萄球菌的第二病因（分别为14%和25%），并且是下呼吸道感染中次于金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌的第四病因（9%）[47]。

3. 致肾盂肾炎型大肠埃希菌 UTI极为常见，每年影响全球约1.5亿人。每年仅在美国就有1000万到1300万例，占所有门诊就诊量的近1%[27,48]。在有性生活的育龄女性中，大多数为非复杂性UTI，但约有10%被归为影响男性、尿路畸形和留置导尿管患者的复杂性UTI。UPEC是最常见的非复杂性UTI和复杂性UTI的病因，分别约占感染的75%和65%[27]。感染主要局限于下尿路（如尿道炎）和膀胱（如膀胱炎），但如果不加治疗，1%～2%的感染会上行至肾，导致急性肾盂肾炎和尿毒症[48-49]。高达80%的肾盂肾炎由UPEC引起[49]。患肾盂肾炎的高危人群包括老年人、孕妇、免疫抑制疾病如糖尿病和恶性肿瘤等的患者、结构或功能异常如膀胱输尿管反流或神经源性膀胱等的患者及留置导尿管等装置的患者[49]。

UPEC具有一组特定的毒力因子，这些因子在其他大肠埃希菌致病变种中基本不存在，而这些致病因子有助于细菌在尿路内黏附、迁移和持留。1型菌毛（如 *fimH* 甘露糖结合菌毛）在UPEC和非致病性大肠埃希菌分离株均有表达；然而，它们在最初与尿路上皮细胞的黏附中起着关键作用，是UPEC发病机制的核心。与肾盂肾炎相关的菌毛（如 *papA* 和 *papG* 编码的菌毛）是UPEC所特有的，存在于约80%的急性肾盂肾炎患者分离株中[48]。相比于粪便中的大肠埃希菌，其他特定的毒力因子，如细胞毒素、溶血素和铁获取系统等，在UPEC中更常见[48]。

虽然UPEC不能从表型与其他类型的大肠埃希菌区分，但70%～80%的UPEC分离株属于8个脂多糖O抗原血清群（O1、O2、O4、O6、O7、O16、O18和O75）之一。特别令人感兴趣的是，大肠埃希菌131型菌株（ST131）最初在2008年被发现，现在占所有产ESBL的大肠埃希菌分离株的22%～66%[50]。大肠埃希菌ST131主要是从肠道外感染中分离，在尿路感染中很常见，包括那些进展为尿脓毒症的感染。这些菌株构成一个独立的谱系和血清群（O25），与典型的UPEC具有许多相同的毒力决定因子，包括 *fimH*（100%）和 *papA*（95%）[50-51]。菌株的耐药性除了存在编码氟喹诺酮类和氨基糖苷类药物耐药基因外，还存在携带CTX-M-15 ESBL基因的质粒。在全球范围内，产ESBL的大肠埃希菌尿分离株中有25%～70%属于ST131，产ESBL的大肠埃希菌血液分离株中有20%～60%属于ST131[50]。

4. 脑膜炎/脓毒症相关的大肠埃希菌 在发达国家，新生儿脑膜炎的发病率为0.3‰，在发展中国家为6.1‰[52]。这些感染在具有围生期危险因素如早产、出生体重低和产科并发症的患者中更为常见。在对B族链球菌进行筛查和产时预防后，大肠埃希菌已成为早发性脑膜炎的主要原因，占总感染的30%～45%，占革兰阴性杆菌导致感染的50%～87%[52-53]。不足为奇的是，在新生儿血流感染中也有该菌，大肠埃希菌约占所有血流感染的30%，占革兰阴性杆菌血流感染的80%。重要的是，15%～38%的细菌性脑膜炎患儿的血培养未报阳，故血培养阴性不能用于排除中枢神经系统感染[52]。MNEC感染也发生在成人患者中，特别是那些具有潜在免疫缺陷的患者和老年人，其中大肠埃希菌是引起医院和社区菌血症的仅次于金黄色葡萄球菌的第二大原因[16]。

在MNEC菌株中，90%的脑膜炎分离株和

60%的血流感染分离株属于12种脂多糖O抗原血清型中的一种，其中许多与UPEC共有[47]。这一发现提示，这些O血清型可能增加了血清抵抗力和(或)降低了免疫原性，这有助于肠外生存和致病。它还使开发MNEC血清型的疫苗成为可能。荚膜K1抗原是许多MNEC菌株的另一个共同特征，有助于MNEC与UPEC的鉴别，后者更常表达K13抗原荚膜。除了血清抗性外，荚膜K1抗原还有助于细菌胞内存活和穿越血脑屏障[16]。从新生儿脑膜炎病例中分离的MNEC中，80%～90%表达荚膜K1抗原[54]。其他毒力因子，包括侵袭素(*ibeA* 和 *ibeB*)和细胞毒坏死性因子1(cytotoxic necrotizing factor 1，*cnf1*)，存在于许多MNEC分离株中，并在穿越血脑屏障中发挥作用[16,55]。体外诊断试验利用K1等遗传标志物对脑脊液(cerebrospinal fluid，CSF)标本中的MNEC进行特异性靶向检测[56]。

5. 致泻性大肠埃希菌 急性肠胃炎是一种常见的疾病，每年约有150万例计划外的门诊病例。其中大多数是由病毒引起的感染，但致泻性大肠埃希菌占所有导致腹泻的细菌性食源性感染的近10%(美国每年超过20万例)[25]。致泻性大肠埃希菌主要有5种类型：产志贺毒素的大肠埃希菌(Shiga toxin-producing *E. coli*，STEC)、ETEC、EPEC、EIEC和EAEC。这些病原体表达特定的因子，包括黏附素、侵袭素和细胞毒素，它们以胃上皮为靶向目标，引起细胞损伤或渗透调节障碍，导致各种类型致泻性大肠埃希菌特有的水样腹泻或血性腹泻。在某些情况下，同一分离株可表达不止一种致泻性大肠埃希菌特有的毒力因子，从而产生一种能够引起更严重的疾病的致病性更强的菌株。

(1)STEC和EHEC：STEC，也被称为产vero细胞毒素的大肠埃希菌，最初被认为具有在非洲绿猴肾细胞(Vero细胞)中诱导细胞病变的能力。所有STEC分离株都编码志贺毒素1(*stx1*)和(或)志贺毒素2(*stx2*)，该毒素因其与1型痢疾志贺菌编码的细胞毒素密切相关而得名[57]。志贺毒素特异性地靶向胃肠道的内皮细胞和肾小球的微血管，阻止其蛋白质的合成[57]。内皮细胞的死亡导致了STEC感染中典型的血性腹泻，并使Stx毒素迁移到血液中，随后引起肾微血管损伤，进而导致溶血性尿毒症综合征(HUS)[57]。HUS的临床特征包括微血管病性溶血性贫血、血小板减少症和急性肾衰竭。引起出血性结肠炎和溶血性尿毒症综合征的STEC菌株被进一步命名为EHEC。除了Stx毒素，EHEC还携带肠细胞脱落位点(locus of enterocyte effacement，LEE)(详见下文“肠致病性大肠埃希菌”)，该位点介导菌株与胃上皮的紧密结合。改善黏附性并产生Stx毒素可加重与EHEC相关的胃肠道症状。Stx1和Stx2有50%～60%的蛋白质同源性，但是它们的免疫学特性不同，毒性也不同[57]。*stx1*与轻度疾病相关，而*stx2*的变异型(如*stx2a*和*stx2d*)与严重的血性腹泻和溶血性尿毒症综合征发病率的增加有关[57-58]。

已经在超过250种大肠埃希菌O血清型中鉴定出志贺毒素1和2，其中约半数与人类腹泻疾病有关[59](表39-2*)。STEC O157血清型在全世界的发病率最高，占所有STEC感染的30%～80%[59]，其中仅在美国每年就有6.5万～7.5万[25,60]。STEC O157的优势可能是其感染剂量极低，只需50～200 CFU即可感染，这使它有别于STEC其他血清型[58]。STEC O157可引起散发性和暴发性感染，美国每年35～45次暴发[60]。40%的STEC O157相关的食源性暴发的源头是牛肉酱，但受污染的农产品和乳制品也经常被认为是食源性暴发的传播媒介[60]。低感染剂量还可以实现人与人之间的传播及被农业径流污染的湖泊等环境水源的传播。STEC O157分离株在EHEC中很重要，并且由于与严重的血性腹泻和发展为危及生命的HUS的关系密切，历来一直是诊断检测的重点。具体地说，感染STEC O157可使住院率达到17%～46%，HUS发生率>4%，病死率达0.5%[25,60]。

在轻度和重度急性胃肠炎中，非O157型STEC血清型的重要性不断凸显。越来越多的基于Stx毒素的诊断测试表明，在美国每年有20%～50%的STEC感染(每年约37 000例)是由非O157血清型引起的。此外，在阿根廷、澳大利亚和德国，非O157血清型占了STEC感染的大多数[59]。其中，O26、O103、O111、O121和O145是

*译者注：原著引用其他著作表格，未经原作者授权翻译，故此保留原表

表 39-2 Frequently encountered serotypes of diarrheagenic *E. coli*[a]

ETEC	EPEC	EIEC	STEC			EAEC
O6:NM	**O55:NM**	O28:NM	O8:H19	**O104:H4**[b]	O128:H2	O3:H2
O6:H16	**O55:H6**	O29:NM	O22:H8	O104:H7	O128:H45	O15:H18
O8:H9	O55:H7	O112:NM	**O26:NM**	**O104:H21**	**O145:NM**	**O44:H18**
O15:H11	O86:NM	O124:NM	**O26:H11**	**O111:NM**	O146:H21	O51:H11
O20:NM	O86:H34	O124:H7	O28:H25	**O111:H2**[c]	O153:H2	O77:H18
O25:NM	**O111:NM**	**O124:H30**	**O45:H2**	**O111:H8**	O153:H25	O86:H2
O25:H42	**O111:H2**	O136:NM	O55:H7	**O113:H21**	O156:H25	O111ab:H21
O27:NM	O111:H12	**O143:NM**	O69:H11	**O118:H2**	**O157:NM**	O126:H27
O27:H7	O111:H21	O144:NM	O76:H19	O118:H12	**O157:H7**	O141:H49
O27:H20	**O114:NM**	O152:NM	O84:NM	O118:H16	O165:NM	ONT:H21
O49:NM	**O114:H2**	**O164:NM**	O88:H25	O119:NM	O165:H25	ONT:H33
O63:H12	**O119:H6**	O167:NM	O91:NM	O119:H4	O172:NM	
O78:H11	**O125:H21**	**ONT:NM**	O91:H14	O119:H25	O174:H21	
O78:H12	O126:NM		O91:H21	**O121:H19**	O174:H28	
O128:H7	O126:H27		O103:NM	O123:NM	O177:NM	
O148:H28	**O127:NM**		**O103:H2**	O123:H11	O178:H19	
O153:H45	**O127:H6**		O103:H11	O128:NM	O179:H8	
O159:NM	O127:H9		O103:H25			
O159:H4	O127:H21					
O159:H20	**O128:H2**					
O167:H5	O128:H7					
O169:NM	O128:H12					
O169:H41	**O142:H6**					
	O157:H45					

[a]Outbreak-related serotypes are shown in bold. NM, nonmotile; NT, not typeable.
[b]STEC/EAEC O104:H4 strain from large foodborne outbreak in Germany associated with fenugreek seeds (261).
[c]STEC/EAEC O111:H2 strain identified from patients associated with an outbreak of HUS in France (262).

最常见引起 HUS 大规模暴发和发病率增加的血清型[58-59,61]。在临床中，与非 O157 STEC 感染(42%～57%)相比，血清型 O157 感染与血性腹泻相关性更高(71%～97%)，而 O157 和非 O157 STEC 引起的其他症状相同，包括发热和腹痛[59]。无论何种血清型，儿童患者(中位年龄 6 岁)发生 HUS 的风险均高于成人[62]。

重要的是，非 O157 STEC 占全球 HUS 的 16%～43%。非 O157 血清型引起的 HUS 的比例反映了从有症状患者中分离出的 O157 和非 O157 血清型的患病率，故非 O157 血清型 STEC 比例最高的国家也是由非 O157 血清型引起 HUS 比例最高的国家[59]。这些数据表明，特定毒力因子(如 *stx2a* 和 *eae*)的存在比血清型更能预测疾病的严重程度。然而，这些基因在某些血清型中比其他血清型更常见，并且因地理区域而异[58,59]。事实上，一项研究发现，与缺乏这些基因的 STEC 菌株相比，携带 *eae* 的 STEC 菌株发生 HUS 的比值比(odds ratio，OR)为 5.8，携带 *stx2* 的 STEC 菌株发生 HUS 的比值比为 9.6[61]。由于对非 O157 型 STEC 引起严重疾病的认识不断提高，联合委员会在 2013 年引入了标准 QSA.04.06.01，该标准要求实验室进行检测毒素，特别是检测志贺毒素或引起社区获得性腹泻的毒素基因，以鉴定非 O157 STEC。

(2)ETEC：ETEC 菌株产生热不稳定和(或)热稳定型肠毒素，这些毒素是发病的关键，并且根据毒素定义了致病型。LT 是由 *elt*A 或 *elt*B 编码的 AB_5 亚单位毒素，与霍乱毒素同源性约为 80%。LT 诱导肠上皮细胞过度产生环 AMP (cAMP)，从而导致 CFTR(囊性纤维化跨膜电导调节器)氯离子通道失调和液体流失[26,63]。ST 诱导细胞内 cGMP 的产生，最终导致多个离子通道失调，进而引起体液流失和再吸收受损[26,63]。包含 LT、ST 或 2 种毒素的 ETEC 菌株的比例随地理区域、年份和研究的不同而有很大差异。一般来说，产 ST 的菌株占 ETEC 的 45%～85%，产 LT 的菌株占 50%～98%，同时产 2 种毒素的菌株占 15%～60%[63]。任何一种毒素的产生都足以引起疾病，同时产 2 种毒素不会加重症状[63]。细菌在胃肠道的定植是由 20 多种菌毛和非菌毛黏附素介导的，这些黏附素可促使 ETEC 黏附肠上皮细胞、聚集和形成生物膜。这些定植因子由质粒编码，在 30%～50%的 ETEC 分离株中缺失。

总之，不同类型LT之间活性的差异和定植因子的多样性可能解释了大便ETEC阳性患者中观察到的症状严重程度的变化和无症状携带的现象。

临床上，ETEC感染可导致儿童和成人出现水样的、不带血的腹泻，常伴有呕吐[63]。发展中国家的亚热带和热带地区是主要的地方性流行区域，这在很大程度上是由于卫生和水处理措施不足。据估计，发展中国家每年发生8.4亿例ETEC感染病例，其中25%～35%感染为4岁以下儿童[26]。据估计，在这些地区，儿童每年将有0.5～1.5个ETEC感染[26]。无症状携带ETEC在流行区域的儿童中很常见。病例对照研究表明，5岁以下儿童的携带率为8%～19%[63]。反复暴露于EPEC可能有助于部分免疫，导致在这一人群中观察到较高的无症状携带率。受感染的人是ETEC的主要宿主，传播途径是粪口传播。ETEC的感染在温暖的月份和季风季节之后达到季节性高峰，这时地表水可能在特定地区受到污染[63]。其他传播媒介包括感染者准备的食品、受污染的饮用水及用受污染的水清洗或灌溉的农产品[26]。

ETEC是一种多样的病原体，分离株至少属于150种O:H血清型和42个不同的克隆群，这些克隆群因地理区域及随着时间流行的变化而变化[26]。在发达国家，ETEC感染主要见于从流行地区返回的个人，占旅行者腹泻的20%～40%。在美国和其他发达国家虽然不太常见，但有疫情暴发的报道。这与进口农产品、食品加工人员的手部卫生不良及食品储存不当有关[26,64]。在发达国家，最近实施的用于检测肠道病原体的多重平台已在0.5%～2.0%的有症状患者中检测到ETEC，这提高了人们对于没有明显旅行史患者中也会出现该病原体的认识[65-66]。重要的是，在这些样本中，有80%～93%同时发现其他细菌或病毒病原体，这使人们怀疑ETEC的致病性和这些结果的临床意义[65,67]。

(3)EPEC：EPEC最初在1945年被认为是婴儿腹泻的常见原因。EPEC菌株不编码经典肠毒素，也不具有侵袭性；它们具有能够诱导肠上皮细胞和微绒毛的结构发生变化的独特能力。因为EPEC能够紧紧黏附在微绒毛上，然后诱导肠上皮细胞出现基座样突起，所以这些病变被称为附着和消退病变。附着和消退病变的发病机制是由染色体编码的称为LEE的基因簇引起的。LEE携带*tir*，编码一种易位的内膜受体，该受体整合到宿主细胞膜中，并将表面暴露在肠腔内。另一种LEE编码的蛋白质称为紧密黏附素(*eae*)，在细菌细胞膜上表达并与Tir紧密结合。通过这种方式，EPEC介导其自身与宿主细胞的特异性结合。LEE编码的其他效应因子调节肌动蛋白聚合，帮助基座形成，引起水通道蛋白的失调，导致细胞液体流失和腹泻，破坏细胞紧密连接，并有助于免疫逃避[26,68]。其他毒力因子在大肠埃希菌黏附因子质粒上编码。其中最值得注意的是介导初始附着肠上皮的Ⅳ型成束菌毛(bundle-forming Pili，*bfp*)和编码*bfp*和LEE的转录激活剂的*perA-BC*[26]。携带LEE并含有大肠埃希菌黏附因子质粒的EPEC菌株被称为典型EPEC，而缺乏该质粒的菌株被称为非典型EPEC[26,68]。

EPEC是一种与小儿持续性非血性腹泻相关的重要病原体，严重时可伴有发热和呕吐[68-69]。与其他引起腹泻的大肠埃希菌病原体一样，主要的宿主是人类和其他哺乳动物的胃肠道。EPEC的感染剂量很高，为10^8～10^{10}个活菌，这降低了其传播和引起重大暴发的能力[26,70]。然而，无论在发展中国家还是发达国家，紧密接触(如日托设施中发生的密切接触)和不良卫生状况均有可能增加传播风险[26]。典型EPEC菌株属于O55、O86、O114、O27和O142血清型，而非典型EPEC菌株通常属于O26、O55、O86、O111、O119和O128血清型[26]。典型的和非典型的EPEC菌株都与地方性和流行性胃肠炎有关[68]。根据培养和血清型分析，EPEC在有症状的患者中分离率为8%～10%，但在需要住院治疗的严重腹泻患者中分离率可高达15%[68-69]。重要的是，在上述血清群中并非所有的分离株都携带LEE基因簇(即不是EPEC)，并且已经在200多种其他O血清型中鉴定出EPEC分离株。总之，这些因素限制了培养和血清分型在诊断EPEC相关腹泻中的作用。

特异性靶向*eae*基因的分子检测技术能够敏感和准确地鉴定粪便标本中EPEC。通过检测，已经在12%～25%的有症状的成人和儿童粪便标本中发现了EPEC，这表明使用培养方法可能低估了EPEC相关的腹泻[65-67]。分子诊断的使用加强了EPEC与儿童腹泻的早期相关性，1～5岁的儿童的阳性率超过45%，而有症状的成人的阳性率为

12%～22%[65]。虽然很常见，但 EPEC 在成年患者中的意义很难评估。含有 EPEC 的腹泻粪便标本中 48%～54%含有其他潜在的病原体，包括诺如病毒（norovirus）、弯曲杆菌（*Campylobacter* spp.）或其他致泻性大肠埃希菌[65,67,71]。比较有症状和无症状成年人的研究发现，两组的患病率相似，均为 23%～37%[71]。一些针对儿童人群的研究显示，有症状患者的阳性率明显高于对照组；而另一些研究则显示，两组的患病率相似[69,72]。这种不一致可能是常见 EPEC 血清型之间致病性的差异或胃肠道细菌负荷差异造成的。靶向 EPEC 中 *eae* 基因的定量 PCR 结果显示，有症状儿童的细菌负荷略高于对照组（299 *vs*. 29 CFU/mg；$P=0.016$）；然而，这种差异仅在<1 岁的儿童中，以及以 EPEC 为唯一病原体时才有统计学意义[73]。

环境和宿主因素可能导致与 EPEC 相关的症状的严重程度和无症状携带者状态的变化。肠上皮细胞上缺乏 Bfp 或其他初始黏附素的特异性受体，可能限制了初始黏附和随后的发病机制。同样，体液免疫可以预防感染或限制症状的严重程度[26,69]。这可能是由于卫生条件差的发展中国家反复接触 EPEC 或母乳中的 IgA 给予了宿主被动免疫[68,69]。上述情况均为无症状携带的发生机制。综上所述，较高的无症状携带率及与其他胃肠道病原体共同检出使 EPEC 阳性结果的临床解释变得复杂。当在腹泻患者中发现 EPEC 时，应考虑患者的年龄、症状的严重程度、是否存在其他病原体及已知的疾病暴发情况。进一步的分子研究可能会揭示毒力因子和宿主因子的特定组合，从而更好地预测这些患者疾病。

（4）EIEC：EIEC 菌株与志贺菌属细菌具有高度的遗传和表型相似性。细胞侵袭、胞内存活及 EIEC 向邻近宿主细胞的直接传播，是由位于毒力质粒 pINV 上的多个基因簇介导的。这个质粒存在于所有 EIEC 和志贺菌菌株中，但可能是由每个菌种独立获得[74]。内皮细胞的破坏导致了有时在 EIEC 感染中观察到血性腹泻。由染色体基因 *set2* 和 *sigA* 编码的肠毒素进一步加剧了细胞体液的流失，导致水样腹泻。这个过程的更多详细信息请参见下面“志贺菌属”的“临床意义”。须注意，效应基因 *ipaH* 在 pINV 和细菌染色体上均存在多个拷贝，并已作为分子检测的靶点，以鉴定粪便样本中的 EIEC 和志贺菌[26,65]。

由于 EIEC 与志贺菌关系密切，而且很难用生化、表型和分子检测方法将其与志贺菌区分开来，故很难确定 EIEC 的流行病学和临床影响。两者最终的鉴别需要进行多种检测，包括对志贺菌中更常见的基因进行 PCR 检测，以及进行血清分型分析[26,74]，但 EIEC 和一些志贺菌血清型之间的交叉反应仍然很常见。EIEC 存在于人类和灵长类动物的胃肠道，传播途径主要是由手部卫生不良引起的粪口传播，但在非洲、亚洲和美洲，包括美国，报道了小规模食源性疾病暴发[26,74]。与此相反，志贺菌是确切的食物和水源性传播暴发的原因，每年在全球范围内影响 1.5 亿～2 亿人。EIEC 感染与志贺菌感染病例能够形成鲜明对比的原因有 2 个。首先，与典型志贺菌感染相比，EIEC 感染的临床症状通常较轻，这可能导致感染报告不足。这可能是由于 *ipa* 和其他几个毒力基因表达降低，从而降低了细胞间的侵袭性、细胞间的扩散及机体对 EIEC 的炎症反应[75]。其次，EIEC 的侵袭性降低，导致感染剂量是志贺菌的 1000～10 000 倍，进而降低了 EIEC 的传播能力[76]。

EIEC 感染的治疗应根据症状的严重程度及患者个体的危险因素，如年龄、合并症和免疫状态而决定。轻度病例通常仅需通过支持性护理和口服补液疗法即可解决。抗生素适用于严重的病例和危险因素明确的患者。抗生素的选择应基于药敏试验结果或当地药敏谱，但可包括环丙沙星、阿奇霉素或头孢曲松[26]。

（5）EAEC：EAEC 是一组异质性的大肠埃希菌菌株，具有共同的发病机制，即增强黏附、形成生物膜和产生细胞及肠毒素[26,77]。菌落相互黏附，并附着在培养细胞系、塑料或其他表面，形成所谓的“堆叠砖”结构[77]。生物膜形成的介质在毒力质粒 pAA 上编码[26,77]。EAEC 菌株在染色体上和 pAA（如 *set*、*sepA* 和 *pet*）上编码多种毒素，这些毒素会增加体液流失，其中许多存在于其他致泻性大肠埃希菌和志贺菌中[26,77]。*aggR* 基因位于 pAA 上，编码生物膜和毒素表达的整体调节子。*aggR* 已被用作鉴定致病性大肠埃希菌的分子诊断靶点[26,77]。携带 *aggR* 的大肠埃希菌分离株被称为典型的 EAEC，而缺乏 *aggR* 但保持 EAEC 聚集表型的大肠埃希菌被称为非典型

EAEC。非典型的EAEC菌株占EAEC感染的25%，尽管缺乏这种整体调节子，但仍有能力形成生物膜并引起急性腹泻[78]。

EAEC感染的典型症状是持续性、非血性、水样腹泻。即使在没有腹泻症状的情况下，慢性定植和生物膜的形成也会破坏正常的肠道功能，导致营养不良和发育迟缓等次要的后遗症[77]。EAEC感染对生活在流行地区的儿童影响最大，在这些地区出现有症状感染的数量可能超过ETEC[79]。未受控制的艾滋病病毒感染者也可能因EAEC感染而导致持续性和严重腹泻的风险增加[26,77]。人类是EAEC的主要宿主，可能通过粪口途径传播。需要10^8～10^{10}CFU高感染剂量才能引起有症状性感染；然而，较低剂量可能足以引起亚临床感染和无症状的携带[70,77]。受污染的水源可能是主要的传染源。在澳大利亚和孟加拉国4%～36%的水源中检测到EAEC[77]。新鲜食品因使用不干净的水进行冲洗或灌溉，或在准备过程中被感染者污染，与疾病暴发有关[26,77,79]。

在发达国家，EAEC一直被认为是旅行者腹泻的一个原因，但分子诊断平台的应用提高了人们对EAEC的认识，它是健康成年人和没有旅行史的儿童偶发性急性胃肠炎的一个潜在原因[65-67]。这些研究将EAEC列为在腹泻性粪便中发现的4种最常见的肠道病原体(EPEC、弯曲杆菌、艰难拟梭菌和EAEC)之一，占总阳性结果的5%～7%。与其他致泻性大肠埃希菌一样，EAEC常在含有其他潜在病原体的粪便中发现。最近的研究报告显示，60%～85%有症状患者的EAEC阳性粪便中至少含有一种与急性肠胃炎相关的细菌或病毒病原体[65,67]。对生活在流行地区的儿童的比较研究表明，儿童无症状带菌率很高，在有症状的病例和对照组中，EAEC的总体患病率相似[77]。临床症状的差异可能与特定毒力基因(例编码菌毛和肠毒素的基因)存在与否有关；然而，单个毒力因子对疾病的贡献尚未完全阐明。综上所述，这些因素使在有症状患者中发现EAEC的解释变得复杂。在评估腹泻患者EAEC的临床意义时，应考虑包括症状持续时间和严重程度、旅行史、是否患有严重或长期疾病的危险因素等。

在EAEC作为病原体的进化过程中，一个重要的进展是通过细菌接合或噬菌体转导获得其他毒力因子的能力。这种遗传物质的交换导致EAEC获得了其他大肠埃希菌病原体(如UPEC、EIEC和EHEC)中典型的毒力决定因子[77]。其中最引人关注的是一株EAEC获得了志贺毒素基因*stx*2，导致2001年和2011年德国2次大规模食源性疾病暴发。这些分离株属于O104血清型，是典型的EAEC，但很少与EHEC相关联[80]。3842例腹泻病例证明了该菌株的致病潜力增加，其中855例(22%)并发HUS[77]。

(6)其他致泻性大肠埃希菌：对从腹泻患者身上分离出的大肠埃希菌的研究已经确定了另外两组大肠埃希菌，它们具有相似的表型、病理学或血清学特性。弥散黏附性大肠埃希菌(diffusely aggregative *E. coli*，DAEC)因其对培养的上皮细胞有弥漫黏附特性而得名。DAEC分离株倾向于更大面积地覆盖于宿主细胞表面，而不是像EAEC或EPEC菌株那样聚集成一个焦点模式[26]。特异性受体介导的DAEC结合能够诱导上皮细胞的结构和功能改变(如微绒毛的丢失)，最终导致腹泻。有部分DAEC能够产生由*sat*编码的细胞毒素。在成人中，没有发现*sat*与腹泻之间的相关性；然而，在儿童中，与不携带*sat*的DEAC对照组相比，腹泻儿童中*sat*的表达更为常见[81]。无症状携带在年龄较大的儿童和成人中很常见，DAEC似乎不是这些人群腹泻的主要原因。然而，慢性定植被认为与炎性肠病(inflammatory bowel disease)和克罗恩病(Crohn's disease)有关[26]。急性有症状DAEC感染最常见于5岁以下儿童，可能是由于肠道屏障和其他宿主防御系统尚未完全发育[81]。在这组有症状患者的粪便中，分离出DAEC的标本多达23%[26]。因为缺乏对这一病原菌的真正定义，以及各分离株之间的遗传异质性，所以无法确定DAEC的实际流行情况和发病率。基于血清型分析的鉴定可能会提供一些价值，正如一项研究证明，有19种DAEC血清型是腹泻患者所特有的，而其他血清型在有症状的患者和对照组中均被发现[26]。

黏附侵袭性大肠埃希菌(adherent invasive *E. coli*，AIEC)目前的定义仅基于与感染相关的侵袭性表型和炎性特征。全基因组研究已经鉴定出多达35个潜在的致病基因岛，编码各种菌毛、表面黏附素、分泌系统、铁捕获蛋白和调节蛋白，其中一些可能参与了AIEC的发病机制[26]。克罗恩病(CD)与AIEC感染之间的相关性已被确认。

多项研究已经从 30%～40%的克罗恩病患者中分离出 AIEC,而在无症状对照组中,这一比例为 0～6%[26]。这种关联的基础可能是克罗恩病患者肠上皮特异性受体表达增强,这些受体是 AIEC 黏附的靶点。需要进一步的研究来明确 AIEC 的致病因素,并确定这种微生物在腹泻疾病中的流行病学和意义。

二、志贺菌属

(一)分类学

志贺菌属由痢疾志贺菌(*S. dysenteriae*)、福氏志贺菌(*S. flexneri*)、鲍氏志贺菌(*S. boydii*)、宋内志贺菌(*S. sonnei*)4 种组成。4 种志贺菌种的染色体大小(4.3～4.8 Mbp)、可读框数(4334～4557)、GC 含量(50.9%～51.2%)相似,且与大肠埃希菌特征相同不易区分[82]。遗传学研究表明,常见的染色体管家基因在典型的大肠埃希菌和志贺菌分离株之间仅有 1.12%的序列差异[83]。这种相关性在致泻性大肠埃希菌分离株所处的志贺菌的系统发育树中得到了证实[84]。大肠埃希菌和志贺菌的主要区别在于志贺菌主动入侵肠上皮的能力。侵袭和细胞内存活是由毒力质粒(pINV)介导的,该毒力质粒存在于所有志贺菌和 EIEC 中。从生化角度看,志贺菌与大肠埃希菌的区别在于:志贺菌属不能发酵乳糖,不能产生吲哚,无动力;然而,EIEC 和其他“无反应”的大肠埃希菌分离株常常具有这些表型和生化特征[83]。因此,需要结合生化和血清学试验结果来正确鉴定志贺菌,并将其与不活泼大肠埃希菌区分开来(表 39-3)。

表 39-3 大肠埃希菌与志贺菌的鉴别

微生物	试验结果[a]					
	赖氨酸脱羧酶	动力	分解葡萄糖产气	醋酸利用	半乳糖二酸盐	乳糖
志贺菌	−	−	−	−	−	−
不活泼大肠埃希菌[b]	d	−	−	d	d	d
大肠埃希菌	+	+	+	+	+	+

注:[a]+.2 天内 90% 或更多阳性;−. 在 7 天内无反应(90% 或更多);d. 不同的反应[+,(+)(可变化),−];改编自 Ewing[263]。[b]无动力的、不产气的生物型,有时称为 Alkalescens-Dispar 生物型

志贺菌的分类传统上是由血清型决定的,4 种志贺菌每一种都构成一个独特的血清群:A 群为痢疾志贺菌、B 群为福氏志贺菌、C 群为鲍氏志贺菌、D 群为宋内志贺菌[85]。除 D 群(*S. sonnei*)仅包含一个血清型外,各血清群进一步分为 14～20 个 O 抗原血清型(表 39-4)[85]。许多血清型与特定的 EIEC O 抗原血清群密切相关,这可能使某些分离株的最终血清学鉴定复杂化。A 群中,1 型痢疾志贺菌携带一种染色体编码的导致严重腹泻和 HUS 的志贺毒素(stx_{1a})[85]。由于在每个血清群内志贺菌血清型与特定的 EIEC 血清型之间存在交叉反应,单纯以血清型为基础的分类和鉴定并不准确[26]。

利用分子方法进行的分类研究将该属划分为 3 个不同的遗传簇(C1～C3),C1 进一步划分为 3 个亚簇(SC1～SC3)[84]。3 个遗传簇中各有多个志贺菌种/血清群;然而,C1 内的亚群主要由一个种/血清群组成。值得注意的是,宋内志贺菌、痢疾志贺菌血清型 1 型、8 型和 10 型,以及鲍氏志贺菌血清型 13 型不属于 C1～C3 群。与其他志贺菌相比,痢疾志贺菌血清型 1 型更接近肠出血性大肠埃希菌,这支持了特定的遗传背景是获得志贺毒素编码基因的先决条件的假设[84]。其余 2 种痢疾志贺菌血清型(血清型 8 和 10)与 EIEC 和 UPEC 分离株表现出更大的遗传相似性[84]。与早期的报道一致,鲍氏志贺菌血清型 13 与其他志贺菌属血清型有较远的亲缘关系,该血清型与阿尔伯蒂大肠埃希菌(*Escherichia albertii*)的基因接近(两者均编码内毒素,携带 *eae*,缺乏志贺菌常见的毒力质粒)[84,86]。这些数据表明,传统的血清学分类不能准确反映所有志贺菌血清型的系统发育关系。遗传学分析为这 4 种志贺菌属/血清群中每一种的血清型提供了更好的分类鉴别,并对当前某些血清型如志贺菌的分类提出了质疑。

表 39-4 志贺菌属、血清群和血清型[a]

种(血清群)	血清型和亚型[b]
痢疾志贺菌(A)	1、2 (O112)、3 (O124)、4、5、6、7、8、9、10、11、12 (O152)、13、14、15
福氏志贺菌(B)	1a、1b、2a (O135)、2b、3a、3b、4a、4b、4c、5a、5b、6、X、Y
鲍氏志贺菌(C)	1、2、3 (O167)、4、5、6、7、8 (O143)、9、10、11、12、13[c]、14、15 (O112)、16、17、18、19、20
宋内志贺菌(D)	不适用:种只有一种血清型

注:[a] 数据来自参考文献[26]和[85];[b] 相关或交叉反应的 EIEC O 抗原血清型在括号内给出;[c] 根据遗传分析,将鲍氏志贺菌 13 重新分类为阿尔伯蒂大肠埃希菌

(二)属的描述

志贺菌属的成员都是无动力,不形成芽胞,无包膜的革兰阴性杆菌。所有的志贺菌都是兼性厌氧菌,能够在普通实验室培养基上生长,包括添加或不添加血液补充物的胰蛋白酶大豆琼脂、MAC 琼脂和胰蛋白酶大豆肉汤[19,83]。几种选择和鉴别培养基也支持志贺菌的生长,通常用于初步筛选或培养(见下文的“分离程序”)。在血琼脂上,35℃培养 16~24 h 后,志贺菌明显为小的、圆形、半透明的圆形菌落。志贺菌易受干燥和酸性 pH 影响,当其他定植菌产酸迅速使标本 pH 降低时,会影响未处理的粪便标本中志贺菌的复苏。从生化反应看,志贺菌将硝酸盐还原为亚硝酸盐,将葡萄糖发酵为酸性终产物但不产气[19,83](表 39-1)。志贺菌不发酵其他常见糖类,包括乳糖和蔗糖,不水解七叶苷,不形成 H_2S,不产生赖氨酸脱羧酶。在该属中,只有宋内志贺菌和鲍氏志贺菌血清群 13 对鸟氨酸脱羧酶呈阳性。宋内志贺菌延长培养后可以发酵乳糖。

(三)流行病学和传播

志贺菌导致全球每年超过 1.6 亿人感染,110 万人死亡[87]。99%以上的感染发生在发展中国家,占所有腹泻的 2%~22%,是 1~5 岁儿童腹泻的主要原因[24,87-88]。志贺菌感染率在亚洲最高,其成人和 5 岁以下儿童感染发病率分别为 2/1000 以上和 13/1000[88]。儿童患严重疾病的风险也最高,历史上粗病死率为 1%~3%。约 70%的感染病例和 60%的死亡病例发生在 5 岁以下的儿童[24,87]。在美国,志贺菌感染的发生率相对较低,每年有 35 万~50 万例[25,89]。与发展中国家一样,大多数感染发生在儿童中,但病死率低于 0.1%。发达国家较低的发病率和病死率得益于更好的卫生习惯、清洁的饮用水和获得医疗保健的机会[85]。过去十年发展中国家因志贺菌感染而导致的儿童病死率显著下降,目前已接近发达国家的水平。这种改善可能与更好的营养、志贺菌感染的早期诊断、抗生素治疗及补充维生素 A 有关[90]。

志贺菌属是严格的人类病原体,尽管巨猿可以作为偶然宿主,但人类仍然是感染的主要宿主。传播途径是粪口传播,或直接通过接触粪便(如脏尿布),或间接通过接触食物、水或其他含有细菌的污染物。有文献报道,男男同性恋也可以通过口—肛门接触传播[91]。志贺菌属的感染剂量极低,仅需要 10~100 个微生物即可引起有症状的疾病[26,70]。志贺菌在中性 pH 条件下可在水中存活 20 天(25℃),4℃条件下可存活 30~40 天[92]。

在发展中国家,受污染的饮用水是感染的主要来源。在美国约 30%的病例中,在制备过程中受到污染的食物是传播的主要媒介,另有 15%的病例来自流行地区返回的旅行者[25]。其余病例可能直接或通过接触污染物传播。日托设施和公共泳池是志贺菌暴发的常见场所,多名家庭成员常常由于密切接触而感染。志贺菌在干燥的表面上培养 4 h 后丧失生存能力,但可在 5 天或更长时间内保持感染性[93]。与日托中心传播最高比值比(OR)相关的因素包括使用奶嘴、配备训练用的厕所、不同年龄的儿童共用厕所设施及处理和(或)清洗脏衣服等[89]。

4 种志贺菌流行病学史和流行区域存在差异。在美国和欧洲,宋内志贺菌是导致感染的主要菌种,1998—2009 年期间占每年感染的 70%~84%。在此期间,福氏志贺菌占感染的 15%~25%,而鲍氏志贺菌和痢疾志贺菌合计仅占 2%~3%[94]。相比之下,福氏志贺菌已经逐渐成为亚洲

和非洲的主要菌种，约占感染的60%。在发展中国家出现福氏志贺菌的同时，这些地区的宋内志贺菌的患病率下降到大约30%。在亚洲和非洲，鲍氏志贺菌约占志贺菌属感染的5%。然而，在亚洲的某些地区，如孟加拉国，当地流行率可能高达23%[88,94]。在发展中国家，痢疾志贺菌的流行率已从7.3%的高水平下降到目前的1.5%。这是由于近年来由高致病性痢疾志贺菌血清1型引起的大规模暴发总体下降所致[26,85,90]。上一次由1型痢疾志贺菌引起的重大疾病暴发发生在1999年的非洲西部，涉及4000多例，发病率>7%[95]。从那时起，1型血清型的局部暴发只有零星或小规模的报道。在发展中国家和发达国家，其他菌种和血清群的暴发仍然频繁，这使过去20年志贺菌感染的总发病率保持不变[87,90]。最近令人关注的是，有报道从加勒比海返回的旅行者中福氏志贺菌和携带*stx1*的4型痢疾志贺菌导致严重痢疾，以及在加利福尼亚暴发了携带*stx*1的宋内志贺菌感染[85,96]。

(四)临床意义

志贺菌引起细菌性痢疾，其典型特征是严重腹泻，并含有由于胃上皮破坏而引起的血液和黏液。然而，症状的严重程度可能因菌种、血清型和宿主特有的风险因素(如年龄和免疫状况)而有很大差异。25%～30%的感染可以观察到粪便中有血液存在，对指导临床诊断缺乏敏感性，但与其他病因导致腹泻的患者相比特异性>90%，比值比>4.5[88]。在非胃部症状中，发热最为明显(35%～45%，*OR*=1.74)，其次是腹部绞痛(15%～22%，*OR*=1.64)[88]。呕吐也很常见，在20%～22%的感染患者中存在，但与非志贺菌腹泻患者相比频率较低(*OR*=0.73)。HIV携带者感染志贺菌的可能性是正常人的7～30倍，由于严重和持续的症状而住院的可能性是其他人的3倍[97]。尽管志贺菌具有侵袭性，但其感染仍局限于局部，细菌很少扩散到大肠和直肠以外。在0.4%～7.0%的1岁营养不良儿童中，血流感染少见，但可能伴随胃肠道疾病[98]。

与志贺菌感染相关的全身性并发症主要包括癫痫发作和HUS，这2种疾病均不涉及胃肠道细菌的传播。5岁以下儿童腹泻后癫痫发生率为1%～11%[88,99-100]。癫痫发作的风险似乎与疾病的严重程度相关，包括脱水和发热，与细菌毒素或其他特定毒力因子的存在无关[100]。而HUS则是志贺毒素介导的肾微血管内皮损伤的直接结果。因此，仅在感染产志贺毒素菌株(主要是痢疾志贺菌血清型1型)之后，才观察到HUS。其症状包括微血管病性溶血性贫血、血小板减少症和肾功能不全，通常在腹泻发作后7～10天出现。感染1型痢疾志贺菌的儿童HUS的发生率为8%～15%，如果处理不当，该病的病死率可高达40%[99]。

与志贺菌感染相关的病理和临床症状是由于细菌免疫逃避、对胃上皮细胞的侵袭和产生毒素所致。志贺菌的所有种和血清型通过M细胞胞吞作用迁移到胃上皮细胞，并侵入胃上皮细胞的基底外侧表面[101]。细胞侵袭、破坏和随之而来的炎症反应会导致血性、黏液性和脓性腹泻，这是志贺菌感染的特征。液体流失是由染色体基因*set1A*和*set1B*编码的肠毒素和染色体*sigA*基因编码的细胞毒素催化所致[85,101]。大多数毒力基因位于一个200 kb的毒力质粒pINV[85]上。具体来说，编码3型分泌系统(*mxi-spa*)的34个基因、转运和细胞内扩散所必需的易位效应蛋白(*ipa-ics*)，以及毒力基因表达调控因子(*virB*和*mxiE*)构成了遗传上的"感染入口区"。最近Mattock等[85,101]对志贺菌分子发病机制进行了全面的综述。1型痢疾志贺菌还携带有志贺毒素基因*stx1a*。该毒素来源于Stx噬菌体P27，该噬菌体整合到痢疾志贺菌血清型1型的染色体中，与肠出血性大肠埃希菌的*stx1*仅存在一个氨基酸的差异[57,101]。Stx的细胞毒性对胃上皮造成广泛的损伤，从而导致严重的腹泻，而对肾血管内皮的损伤则导致HUS[57]。stx_{1a}很少在其他志贺菌属中发现，包括痢疾志贺菌血清型4型和福氏志贺菌。与典型的1型痢疾志贺菌类似，这些菌株能够引起严重的血性腹泻和HUS的暴发。

免疫能力强的成人感染志贺菌后，通过对症治疗通常能在5～7天内恢复。但如果没有有效的抗生素治疗，这些人可能持续排出活菌至4周，即使症状消失后仍具有传染性。严重腹泻患者和高危人群包括免疫功能低下人群和儿童，可从及时的抗生素治疗中获益。在非洲暴发痢疾志贺菌期间，未接受抗生素治疗的患者病死率为

3%～6%，而接受环丙沙星治疗的患者的病死率小于1%[95]。对中度和重度感染，有效的抗生素治疗也可减少志贺菌持续排菌时间，减少向未感染个体传播，以控制疫情的暴发[102]。从事食品服务行业的个人、卫生保健工作者、日托服务人员和在学校或日托中心的儿童在症状缓解后24～48 h内不应重返工作岗位或学校。一些雇主可能会额外要求在重返工作岗位之前提供粪便培养阴性的报告。

三、沙门菌属

(一)分类学

早期沙门菌属成员的鉴定依赖于其独特的鞭毛(H)和多糖(O)抗原类型。每一个独特的O血清型由a～z中的一个字母表示，并用a～z中的一个字母和阿拉伯数字表示超过26种确定的O型血清型。随着独特血清型的增加，这种方法被生化和分子方法所取代，以确定血清型之间的亲缘关系。目前，沙门菌属仅由两种沙门菌组成，即肠沙门菌(*Salmonella enterica*)和邦戈尔沙门菌(*Salmonella bongori*)；然而，根据遗传相似性，肠沙门菌有6个亚种。每个亚种都有一个亚种名或组号：肠沙门菌肠亚种(*S. enterica* subsp. *enterica*)(第1组)、肠沙门菌撒拉姆亚种(*S. enterica* subsp. *salamae*)(第2组)，肠沙门菌亚利桑那亚种(*S. enterica* subsp. *arizonae*)(第3a组)、肠沙门菌双亚利桑那亚种(*S. enterica* subsp. *diarizonae*)(第3b组)、肠沙门菌豪顿亚种(*S. enterica* subsp. *houtenae*)(第4组)和肠沙门菌印度亚种(*S. enterica* subsp. *indica*)(第6组)。在每个亚种内具有临床或流行病学重要性的血清型也可被赋予一个共同的名称，如肠沙门菌肠亚种伤寒血清型(*S. enterica* subsp. *enterica* serotypes Typhi)和肠沙门菌肠亚种肠炎血清型(*S. enterica* subsp. *enterica* serotype Enteritidis)可分别命名为伤寒沙门菌和肠炎沙门菌。值得注意的是，所有的伤寒沙门菌菌株都属于O抗原血清群D，该血清群仍可用于鉴定该血清型[103-104]。DNA-DNA杂交实验表明，所有肠沙门菌血清型之间有大于80%的相关性，超过了用于定义一个物种的公认阈值(70%)[105]。邦戈尔沙门菌(第四组)与肠沙门菌只有45%～50%的亲缘关系，并被指定为一个单独的物种[104]。在肠杆菌科中，沙门菌与枸橼酸杆菌、大肠埃希菌、志贺菌的序列相似性最大(45%～50%)，其次是克雷伯菌和肠杆菌(30%～40%)，与沙雷菌和变形杆菌的序列相似性最小(7%～28%)[105]。

肠沙门菌的染色体为4.3～5.0 Mbp，携带4500～5400个基因[106]。所有血清型的核心基因组均为150万bp；然而，96%以上的血清型包含一个保守的核心，大小为3.2 Mbp，大致相当于总基因组的70%[107]。核心基因组的肠沙门菌血清型之间的差异约为1%，与大肠埃希菌的核心基因组相比差异为10%[106]。利用全基因组分析技术，可以鉴定出每个亚种特有的遗传标志物，从肠沙门菌肠炎亚种的9个到肠沙门菌亚利桑那亚种的207个[107]。这些研究支持了早期DNA-DNA杂交和基于酶电泳的分类将肠沙门菌分为6个亚种或类群。类似的全基因组分析无法建立能够唯一识别亚种内血清型的遗传标志物；但是，鉴定出了每种血清型普遍存在或不存在的标志物集合。这些发现表明，沙门菌亚种内具有高度遗传保守和异质性，异质性可能导致不同血清型致病性和抗菌药物耐药性特征的差异。

在沙门菌血清型中有限的宿主范围和发病机制中，肠沙门菌肠炎亚种伤寒血清型、甲型到丙型副伤寒都是独特的。从遗传学上讲，伤寒沙门菌分离株是高度克隆的，无论其地理来源如何，也不会与其他肠沙门菌肠炎亚种之间聚集[104,106]。伤寒沙门菌拥有最大通用遗传标志物集合，与肠沙门菌血清型相同，但包含最少的亚种遗传标志物[107]。这2种特征都表明，随着血清型适应于人类宿主，血清群最近出现了分化，随后基因组出现了衰变[106]。伤寒沙门菌和副伤寒沙门菌C也表达Vi荚膜抗原，这在沙门菌血清型中是独特的。这种抗原具有抗吞噬、抗炎和帮助细菌细胞内生存的作用，有助于该菌引起全身性疾病[108]。这种抗原的存在通常被用于血清学鉴定伤寒沙门菌，但Vi的表达可能会根据体外生长条件而变化。涉及Vi(*tviB*和*viaB*)的调控和表达的相关基因分子检测已被用于鉴定缺乏Vi表型表达的伤寒沙门菌。

(二)属的描述

沙门菌是能运动的、无芽胞形成、兼性厌氧革

兰阴性杆菌，其宽度约为 1 μm，长度为 2～5 μm。它们可以在最常见的实验室培养基上培养，包括带有或不带羊血的 MH 琼脂、MAC 琼脂、胰蛋白酶大豆肉汤，以及用于粪便标本中分离沙门菌的各种选择性和鉴别培养基（参见下面的"分离程序"）。当在 35℃ 的血琼脂上培养时，菌落大，潮湿，呈灰色到半透明，培养至少 12～16 h 后可能会很明显。运动是由多个均匀分布的鞭毛驱动的，可以在半固体琼脂中观察到，也可以通过显微镜观察水中或培养液中的细菌悬浮液。除肠沙门菌肠炎亚种伤寒血清型不产气外，沙门菌属均为氧化酶阴性，通过产气发酵葡萄糖。除肠沙门菌肠炎亚种副伤寒血清型外，沙门菌对赖氨酸脱羧酶呈阳性反应，>98%的菌株发酵乳糖和蔗糖，吲哚、脲酶和 β-半乳糖苷酶阴性（表 39-1 和表 39-5）。超过 90% 的沙门菌菌株产生 H_2S，但肠沙门菌肠炎亚种伤寒血清型和甲型副伤寒血清型很少产生 H_2S。

表 39-5 用于鉴别沙门菌与其他肠杆菌科细菌及鉴定沙门菌伤寒血清型和沙门菌甲型副伤寒血清型的表型特征[a]

试验	反应		
	非伤寒沙门菌亚型 I	沙门菌伤寒血清型	沙门菌甲型副伤寒血清型
三糖铁	K/A,g	K/A	K/A,g
硫化氢（三糖铁）	+	+^{weak}	−or+^{weak}
吲哚	−	−	−
甲基红	+	+	+
V-P 试验	−	−	−
柠檬酸	+	−	−
脲酶	−	−	−
赖氨酸脱羧酶	+	+	−
精氨酸二水解酶	+	d	(+)
鸟氨酸脱羧酶	+	−	+
动力	+	+	+
变异	+	−	−
丙二酸	−	−	−
L(+)-酒石酸盐（*d*-酒石酸盐）[b]	+	+	−
KCN 生长	−	−	−
葡萄糖	A,g	A	A,g
乳糖	−	−	−
蔗糖	−	−	−
水杨苷	−	−	−
己六醇	A,g	−	A,g 2^{days}
肌醇	d	−	−
山梨醇	A,g	A	A,g
α-硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷	−	−	−
半乳糖醛酸酯	−	−	−

注：[a]在 37℃下温育后的反应。缩写和符号：+. 2 天内 90%（或更多）的菌株是阳性的；(+). 可变的，3 天或更长时间的阳性反应；−. 在 7 天内无反应（90%或更多）；A. 产酸；d. 不同的反应[+,(+),−]；g. 产气；K. 碱性斜面。在发布者许可下改编自参考文献[2]。[b]酒石酸钾钠[263]

表 39-6 用于分离大肠埃希菌、沙门菌和志贺菌的常用培养基的部分列表

培养基	用途	生长特性		
		大肠埃希菌	沙门菌	志贺菌
肉汤				
GN	选择性富集革兰阴性杆菌。最常用于 STEC EIA	浑浊生长	浑浊生长	浑浊生长
亚硒酸盐	选择性富集沙门菌和志贺菌	部分没有生长	浑浊生长	浑浊生长
RV	选择性富集沙门菌	抑制	浑浊生长(可以抑制伤寒沙门菌血清型)	抑制
BPW	富集缺陷型沙门菌	浑浊生长	浑浊生长	浑浊生长
MAC	选择性富集革兰阴性杆菌,最常用于 STEC EIA	浑浊生长	浑浊生长	浑浊生长
琼脂培养基				
XLD	分离沙门菌和志贺菌的选择性培养基	小,微黄,可能有胆汁沉淀物	红色伴中心黑色	红色
HE	分离沙门菌和志贺菌的选择性培养基	小,微黄,可能有胆汁沉淀物	绿蓝色伴中心黑色	蓝绿色
SS	分离沙门菌和志贺菌的选择性培养基	小,粉红色至红色	无色伴中心黑色	无色
MAC	革兰阴性杆菌选择性培养基	粉红色	无色	无色
SMAC	用于鉴定可能为 O157 分离株的选择性培养基	大部分 O157 无色,粉红色	粉红色	多变的
BBL CHROMagar *Salmonella*	沙门菌的选择性显色琼脂	蓝色	淡紫色	蓝色[a]
Oxoid *Salmonella*	沙门菌的选择性显色琼脂	蓝色	品红色	蓝色或品红色(宋内志贺菌或痢疾志贺菌)
CHROMagar STEC	产生志贺毒素 1 或 2 的菌株选择性显色培养基	淡紫色	蓝色或无色[a]	蓝色或无色[a]
CHROMagar O157	O157 分离株的选择性显色培养基	淡紫色	蓝色或无色[a]	蓝色或无色[a]

注:[a] 包装说明书未指定

(三)流行与传播

目前全世界已知的沙门菌 O:H 血清型有 2500 多种[109]。肠沙门菌肠炎亚种(包括伤寒血清型、副伤寒血清型、鼠伤寒血清型和肠炎血清型)占所有血清型的 60%,占人类感染的 99% 以上[109-110]。其余的 5 个肠沙门菌亚种和邦戈尔沙门菌主要是冷血动物的环境分离株或病原体,很少与人类疾病有关[109]。胃肠道疾病是沙门菌感染最常见的表现形式,据估计全球每年近 1 亿人受到影响[111]。这大约相当于所有腹泻病例的 3%。感染区域发病率差别很大,从中美洲和北美洲的 250/100 000,到欧洲的 690/100 000,以及东亚和东南亚的近 4000/100 000。与非伤寒沙门菌感染相关的病死率为 0.1%～0.5%,但它会根据宿主因素(如营养、免疫功能低下和获得医疗保健)而有所不同[25,111]。伤寒沙门菌和副伤寒沙门菌感染可导致一种全身性疾病,通常称为肠热病,这是亚洲、南亚和南非的地方病。在巴基斯坦和印度,肠热病的发病率最高,每 10 万人中有 200～450 例,病死率为 1%～7%[112]。北美和欧洲的肠热病发病率较低,70%～80%的病例出现在从流行性地区返回的旅行者中[25,113]。

非伤寒沙门菌(nontyphoidal Salmonella,

NTS)是野生禽类和家禽胃肠道的常见菌群，是重要的感染源，但也常从温血哺乳动物和爬行动物中分离。感染后人类慢性无症状携带NTS是罕见的，发生率约为1∶1000，可作为感染源[103,112]。90%～95%的沙门菌感染是食源性的[25,111]。在美国，沙门菌是细菌性食源性疾病的主要原因，每年有超过100万例感染（占所有细菌性食源性疾病的1/3）[25]。最常见的与沙门菌传播有关的食物是未煮熟的家禽和鸡蛋；然而，最近在美国和欧洲暴发的大规模疫情显示，新鲜农产品和加工食品，如巧克力和花生酱也可导致感染[112]。此外，如果制备食品的工具或物体表面（如砧板）被污染，食品也可能被交叉污染。将沙门菌接种到木制或塑料砧板30min后可培养出40%～100%的细菌，沙门菌在干燥的表面可以存活大于24 h。所有沙门菌的血清型都不耐酸，易受胃低pH影响；因此，经摄食的感染剂量较高，范围为10^5～10^{10}个活菌[70]。感染剂量的差异可能是血清型特异的，并可受到食品载体的影响，高脂肪食品和牛奶由于中和了胃的pH而具有较低的感染剂量。

伤寒沙门菌和副伤寒沙门菌是严格意义上的人类病原体，没有动物或环境宿主。与其他血清型相比，可能更容易受到环境压力的影响，在无生命的表面上仅存活6 h[114]。在感染了伤寒沙门菌或副伤寒沙门菌的人中，有多达5%的人会成为慢性无症状携带者，并能在长达10年的时间里持续排出这种细菌[115]。这种携带通常局限于胆囊，90%的携带者有胆结石，并在胆结石表面形成生物膜。这可能有助于细菌持续存在并且抵抗去定植抗菌药物的治疗[115]。

（四）临床意义

在健康成人中，NTS感染是一种自限性疾病，其特征是非血性腹泻，有时伴有恶心、呕吐和发热。疾病通常局限于胃肠道，很少传播到肠道外部位。在摄入细菌后6～72 h的短潜伏期后出现症状，并持续3～10天[103,112]。在少数情况下，无症状的胆囊定植可导致慢性炎症，并可能增加胆囊炎和胆石症的风险，而成为胆囊癌的主要危险因素[115-116]。婴儿和服用抗酸剂或质子泵抑制剂的人胃酸度降低会增加其易感性[103]。HIV感染、脾功能不全、糖尿病、医源性免疫抑制的患者和老年人感染的风险是普通人群的20倍[103,112,117]。血流感染（BSI）使小于5%NTS患者的胃肠道感染复杂化。实体瘤、糖尿病、艾滋病或血液系统恶性肿瘤患者占NTS所致BSI的60%以上；然而，幼儿和老年人也有较高的风险发展为BSI[118]。在50岁以上的成年人中，25%～35%的BSI是由于NTS所导致的心内膜炎[103]。单因素分析显示，年龄65岁以上和免疫抑制患者与NTS菌血症后病死率增加在统计学上有相关性（病死率为29%～35%；*OR* 为5.8～6.8）[118]。重要的是，小于10%的NTS菌血症患者有胃肠炎病史[119]。因此，无腹泻不应排除怀疑沙门菌菌血症的可能性，特别是在免疫抑制人群中。免疫抑制人群也有可能发生严重的肠外感染，如脑膜炎、骨髓炎、肺炎和感染性关节炎[112]。在儿童中，免疫抑制儿童肠外感染的发生率为25%～30%，次于BSI，而具有免疫能力的儿童的肠外感染发生率小于4%[103]。在成人免疫抑制患者中，15%～20%会发生转移性局灶性感染，并伴有16%的病死率[103]。

伤寒和副伤寒是由A、B、C型伤寒沙门菌和副伤寒沙门菌引起的全身性感染。这些情况在临床上难以区分，统称为肠热病。与NTS疾病不同，肠热病起病缓慢，其特征是约1 CFU/ml的低水平菌血症，随后播散到肠外，包括肝、脾、骨髓和胆囊[120]。摄入细菌后潜伏期一般为7～14天，最初的症状是非特异性的，包括低热、头痛、咳嗽、肌痛和全身不适[120]。可能出现恶心和腹部不适，但腹泻在免疫能力强的人群中罕见。如果不及时治疗，多达30%的病例可进展为高热，并出现腹部、手臂和腿部的斑丘疹[120]。长时间未经治疗的感染（>2周）患者可能出现更严重并发症，包括消化道出血或穿孔、肝炎、心肌炎、谵妄、脑膜炎、肺炎、弥散性血管内凝血和感染性休克。在美国，肠热病患者的住院率大于60%；然而，在肠热病流行的发展中国家，60%～90%的感染未报道或在门诊通过经验性抗生素治疗得以控制[113,120]。如果不及时治疗，总病死率小于1%，但住院的重症患者如果没有接受适当的抗生素治疗，总病死率可达30%～50%[120]。5%～10%的患者在症状缓解后1个月内出现复发，但临床症状较轻。

沙门菌的发病机制是由其能在胃上皮细胞中主动侵入和复制，以及逃避吞噬细胞清除驱动的。与其染色体编码的效应器（如 *sipA*、*sipC*、*sopE* 和 *sptP* 编码的效应器）协同作用，通过称为膜波

动(membrane ruffling)的过程来调节宿主细胞的肌动蛋白细胞骨架和诱导细菌的吞噬[121]。这是一个快速的过程,发生在细菌与上皮细胞接触的10～15 min内,不会引起细胞病变或死亡[121-122]。额外的效应物刺激体液流失和炎性细胞因子的表达,导致巨噬细胞和中性粒细胞的涌入和水样腹泻。

伤寒沙门菌和副伤寒沙门菌可引起全身性感染(即肠热病)。由于缺乏动物模型,影响了对这种发病分子机制的理解;因此,目前的认识主要是基于鼠伤寒沙门菌实验,这种细菌会导致小鼠患上伤寒样疾病。伤寒沙门菌编码一种独特表面表达蛋白,称为 Vi 抗原(*viaB*),并携带一组 NTS 所缺乏的假设毒素编码基因[122]。在小鼠模型中,Vi 抗原的表达抑制宿主对细菌的炎症反应,并增加细菌向脾和其他器官的扩散。由 *pltA*、*cdtB* 和 *pltC* 编码的推定细胞毒素由胞内细菌和靶宿主 DNA 表达[122]。综上所述,这种免疫抑制和细胞毒性可能是肠热病患者病程缓慢、扩散、持续性和复发的关键因素。

四、标本的采集、转运和储存

(一)最优标本

本手册第 19 章描述了肠道病原体的收集、运输和储存的详细方法。特别是肠胃炎分离的大肠埃希菌、志贺菌、沙门菌,新鲜粪便样本是首选样本,应该在采集后 2 h 内培养或转移到无营养的缓冲转运培养基(有关转运培养基的详细信息,请参阅"标本的转运和储存")并将标本保存于 4℃[123]。收集粪便时并不严格要求使用无菌容器,但应避免马桶水或尿等污染源污染样本。对于仍包着尿布的儿童,建议使用多种商业收集设备,常见的收集方法是用保鲜膜包裹尿布或使用不吸水的尿布。使用塑料屏障可以防止粪便样本浸入尿布。获取儿童粪便标本可能比较困难,因此许多实验室推荐采集直肠拭子,特别是用于分子研究,这些研究表明粪便与直肠拭子敏感性类似。

直肠拭子的使用取决于实验室的护理标准。虽然直肠拭子可用于培养,但其敏感性低于杯状粪便标本。通过比较配对直肠拭子和粪便标本来鉴定氟喹诺酮耐药大肠埃希菌,发现与粪便培养相比,直肠拭子的敏感性仅为 90%[124]。直肠拭子对沙门菌属培养的敏感性更低,仅为 64%[125]。志贺菌属的分离可能是个例外。有研究表明,传统的人造丝纤维直肠拭子对志贺菌的培养效果比粪便培养提高近 2 倍[126]。分子方法检测直肠拭子标本是可接受的,因为对比粪便和直肠拭子的检测结果没有差异,可能是由于分子检测比培养更敏感[127-128]。在接收直肠拭子时,实验室应仅接收有明显污迹的拭子,以确保正确采样。

除了样本类型和运送容器外,样本采集的时间和采集的数量也会对检测的敏感性产生显著影响。在感染的急性期收集单个粪便标本,可在 94%～98%的社区获得性腹泻的病例中获得病原体[129-130]。当培养阴性时,可再次获取粪便标本,但应在不同的日期收集[123]。当前指南规定,利用培养方法完全排除细菌感染可能需要至少 3 次大便标本[129]。但是,对于住院时间超过 3 天的患者,不应常规送检用于非艰难梭菌检测的粪便标本,因为研究表明,几乎没有从这些患者身上发现致病菌[131]。对于儿童,由于饮食不正常可能延长至 4 天[130]。用分子方法检测多个粪便的效果尚未得到评价。由于分子方法比培养法更敏感,因此对同一患者的其他标本进行检测的效果可能有限,而且成本效益不高。

根据患者旅行史和症状怀疑有伤寒时,可进行血液、骨髓、十二指肠内容物和(或)尿标本的培养。当采集血液进行培养时,按照标准抽取 40～60ml 血液,分别注入 2 套或 3 套血培养瓶中;然而,由于在伤寒沙门菌感染中血液细菌含量较低,为获得最佳敏感性,每瓶应添加 10ml 血液[120]。40%～70%的病例血培养呈阳性,且发病的第 1 周观察到的阳性率最高[132-133]。成人骨髓和十二指肠内容物是伤寒沙门菌培养敏感性最高的标本,但由于有创操作而很少进行该部位标本采集。在确诊的伤寒病例中,无论使用何种抗生素,这些培养物的阳性率均可达到 80%～90%[132-133]。在儿童患者中,2～6 岁儿童十二指肠内容物的诊断价值不大[134]。粪便培养不能用于诊断,因为只有 30%的伤寒患者能够从粪便中培养出细菌[120]。尚未评估粪便标本的分子检测对伤寒辅助诊断的影响。

(二)标本的转运和储存

粪便标本的运送是获得粪便培养高质量结果

的关键。研究表明，菌群会随着时间的推移发生变化，其中最显著的变化是志贺菌的生存能力降低，这是由于粪便温度随体温降低而引起的 pH 变化[135]。为了尽量减少这些变化，收集的粪便应在 2 h 内进行检测。如果检测延迟超过 2 h，疾病预防控制中心（CDC）建议将未经处理的粪便在<－15℃冷冻，将直肠拭子在－70℃冷冻，直到可以检测为止；然而，更实际的做法是将粪便接种到运送培养基中，以稳定微生物种群，可在室温下保存 2～3 天。关于分子检测，粪便标本的运送和储存要求与细菌培养要求一致。

有多种运送培养基可供使用，包括 Cary Blair 培养基、缓冲甘油盐水、Para-Pak C & S、Stuart 和 Amies 培养基和 FecalSwab。对 Cary Blair 和 Para-Pak C&S 培养基的稳定性进行了掺杂实验。在这些研究中，25 个分离株（包括沙门菌、志贺菌、耶尔森菌、弯曲菌和弧菌）以 1.5×10^4 CFU/ml 接种，4 ℃保存 96 h，并进行菌落计数以确定其稳定性。这项试验的数据表明，除弯曲菌外，2 种保存方法都能充分地恢复所有微生物[136]。还研究了分离志贺菌标本的最佳保存方法。结果显示，在所有保存条件下，缓冲甘油盐水优于 Cary Blair[135]。其中差异最大的是，在室温下，缓冲甘油盐水可从 84.6%的志贺菌阳性粪便中培养出该菌，而 Cary Blair 仅能从 12.5%的粪便中培养出该菌。这些数据还表明，运送培养基的冷冻可以最佳地保持生物体的生存能力，建议在保存时间超过 3 天时使用[135]。

五、直接检查

直接显微镜查检粪便样本的用途有限。粪便标本的革兰染色是无用的，因为无法将大肠埃希菌、志贺菌和沙门菌与构成正常菌群的其他革兰阴性杆菌区分开。更有用的是，直接镜检无菌液体，如脑脊液，有助于检测细菌性脑膜炎并指导经验性治疗。在革兰染色前，脑脊液应浓缩集菌，与培养相比，敏感性可提高 67%[137]。当将支持细菌性脑膜炎诊断的特异参数与革兰染色结合使用时，可提高检测敏感性。在一项回顾性研究中，对 295 例患者进行了脑脊液培养，当脑脊液白细胞计数>321 细胞/μl 时，预测细菌性脑膜炎的敏感性为 80.6%[138]。

未离心尿标本革兰染色的阳性预测值为 80%，如果观察到一种或多种微生物，则可报告细菌生长[139]。由于敏感性低及收集过程中易被污染，因此通常不要求进行此检测，因可能会导致结果误判[140]。

六、分离程序

(一)粪便培养标本的富集

从粪便样本中富集大肠埃希菌有两个特殊的功能——提高产志贺毒素菌株的检测，以及确定氟喹诺酮耐药菌株定植的个体。许多志贺毒素酶免疫测定法（EIA）通过了美国 FDA 的批准，可以直接从粪便中提取，但富集会增加毒素浓度，提高检测效果[141]。用于此富集的经典肉汤是 GN 肉汤，在 37℃下孵育过夜[142]。下文详细介绍了 EIA 的性能和分子学检测 *stx1*、*stx2* 的细节。

对接受经直肠超声引导前列腺活检的患者，在实验室用富集肉汤检测氟喹诺酮耐药菌定植越来越普遍。在这些患者中，胃肠道术后感染可引起并发症，因此需要预防性给予氟喹诺酮类药物。近年来，耐氟喹诺酮类革兰阴性杆菌呈上升趋势，并引起感染。与这些感染相关的最常见菌株是产 ESBL 的大肠埃希菌 ST131 克隆群，该克隆群在后面的“抗菌药物敏感性”中有更详细的描述。一项对 245 618 例患者在 13 年内接受经直肠活检的回顾性研究中，由于氟喹诺耐药导致大肠埃希菌 UTI 的患者增加了 5 倍，活检后大肠埃希菌菌血症患者增加了 4 倍[143]。术前 1 周筛查氟喹诺酮耐药革兰阴性杆菌，可有助于指导术前预防，减少术后并发症[144]。这种方法的有效性的改变取决于当地流行病学和筛选方法。一种筛选方法是将直肠拭子接种到含有 5 μg 环丙沙星片的脑心浸出液肉汤中，并在 35℃下需氧孵育 18～24 h。孵育后，将 100 μl 肉汤置于 MAC 琼脂培养基上。任何生长的微生物都应传代到血琼脂平板（blood agar plate，BAP）上进行传代培养、鉴定并检测，以确定其对环丙沙星的耐药性。含 10 μg/ml 环丙沙星的显色琼脂在富集后可快速筛选氟喹诺酮的耐药性[145]。

由于这些感染是由少量细菌引起的，为分离沙门菌和志贺菌而富集粪便培养物可以增加培养的敏感性。有多种富集肉汤可供选择，包括亚硒

酸盐肉汤(selenite broth,SB)、Rappaport-Vassiliadis (RV)肉汤、缓冲蛋白胨水(buffered peptone water,BPW)、GN 肉汤和 MAC 肉汤,其中 GN 肉汤和 SB 是最常用的培养基[123]。这些肉汤具有选择性,可抑制革兰阳性菌和多种革兰阴性菌的生长,包括大肠埃希菌[146]。大多数肉汤保存在(35±2)℃、5%CO_2 培养箱中,但可能随着孵育时间长短而变化。例如,GN 肉汤只需孵育 6~8 h(否则,正常微生物菌群可能开始过度繁殖而超过这些病原体),而 SB 则应孵育 18~24 h[146-147]。孵育后,需将肉汤接种到固体培养基上进行鉴定。由于周转时间的延迟,并不是所有的实验室都进行沙门菌和志贺菌的富集培养。

使用 SB、RV 肉汤和 BPW 对 1096 份粪便进行直接培养,所有 3 种肉汤都提高了沙门菌的分离率[148]。直接接种检出 102 份沙门菌阳性粪便,而 SB 富集检出了 177 份,RV 肉汤检出了 197 份,BPW 检出了 180 份。其他报告也显示了类似结果,如一项研究使用 SB 富集法从 3977 份粪便中额外分离出 26 株沙门菌株[149]。RV 肉汤可以抑制伤寒沙门菌的生长,这也是 SB 或 GN 肉汤在实验室中更常用的原因。

(二)非粪便标本的富集

富集常用于细菌含量较低的标本,如脑脊液(CSF)、无菌体液、血液和组织标本。富集应选用非选择性肉汤,如胰蛋白酶大豆或巯基乙酸盐肉汤,以允许革兰阴性菌以外的细菌生长。浓缩的脑脊液标本应接种于富集肉汤和固体培养基。孵育时间长短取决于采集方法,经腰椎穿刺收集的脑脊液标本需有氧培养 5 天,厌氧培养 7 天。从分流器收集的脑脊液标本中检出特定菌属(如丙酸杆菌属和芽胞杆菌属),培养 10 天,检出率可提高;然而,这些细菌的临床意义尚不清楚[150-151]。

从无菌体液中检出病原体的另一种富集方法是将标本接种到血培养瓶中。在一项研究中,412 份无菌体液随机分为两组,一组接种到 BACTEC 血培养瓶(Becton Dickinson,Sparks,MD)中,另一组采用常规培养方法,结果显示,接种到 BACTEC 血培养瓶的标本培养出的菌量比常规培养高 14.9%[152]。另有研究发现,将关节滑膜液接种到血培养瓶中可以提高敏感性(21%)[153]。除了提高敏感性外,由于监测系统比传统方法更快地检测到细菌生长,周转时间也相应缩短。一项比较 BacT/Alert FAN 瓶与琼脂、肉汤接种的研究发现,BacT/Alert FAN 检测到重要病原体的时间比标准方法快 10 h[154]。

(三)一般培养基生长要求

从正常粪便菌群中分离、鉴定大肠埃希菌、志贺菌和沙门菌需要几种选择性琼脂培养基来提高敏感性。至少应使用四种培养基,包括 MAC 琼脂培养基、用于鉴定沙门菌和志贺菌的选择性琼脂培养基、用于筛选 STEC O157 的选择性琼脂培养基和用于筛选弯曲菌的选择性琼脂培养基(见第 58 章)[123,142]。许多实验室添加 BAP 以改善对气单胞菌、邻单胞菌和弧菌的检测,也可以对其进行生化鉴定。下面将详细讨论上述选择性培养基,常见培养基列表见表 39-6。微生物(不包括弯曲菌)需要在标准的孵育条件下生长,(35±2)℃,孵育 18~48 h;为了分离空肠弯曲菌,建议将培养板孵育 72 h。为了鉴定空肠弯曲菌,培养基应在 42 ℃的微需氧环境中孵育。对非粪便标本(包括尿、脑脊液和无菌液体),应当使用 BAP 和 MAC 琼脂培养基进行细菌分离。

(四)大肠埃希菌的琼脂培养基

用于分离大肠埃希菌的培养基取决于培养的标本。对于无菌来源的标本和尿,BAP 和 MAC 琼脂足以分离。粪便培养需要选择性更强的培养基来区分特定的胃肠道致病菌和正常的革兰阴性菌群。在这些致病菌中,实验室能鉴定出 STEC O157 很重要,因为已知该血清群会引起严重胃肠炎的暴发[60]。美国 CDC 指南指出,为了从粪便标本中分离出 STEC O157,应使用山梨醇 MAC (SM-AC)琼脂或含头孢克肟和亚碲酸盐的 SMAC 琼脂(CT-SMAC 琼脂)培养基[123]。与 SMAC 琼脂相比,CT-SMAC 琼脂具有更强的选择性,增强了分离效果,但某些对亚碲酸盐敏感的 STEC 菌株不生长[155]。使用 CT-SMAC 琼脂培养基的实验室也应同时接种 SMAC 琼脂培养基,以分离这些敏感株。大部分 O157 菌株由于不发酵山梨醇而无色;然而,有报道称少数 O157 株能够利用山梨醇作为碳源[156]。SMAC 琼脂培养基需要在 24 h 内读取颜色,因为某些 O157 分离株能够缓慢发酵山梨醇而导致菌落颜色改变,或随着时间的推

移山梨醇耗尽而导致菌落粉红色消失。图 39-1 展示了 O157 在 SMAC 琼脂上的常见反应。《临床微生物学程序手册》建议至少将 4 个山梨醇阴性菌落在 BAP 中传代，并检测细菌氧化酶和吲哚的产生[123]。氧化酶阴性、吲哚阳性的菌株应确认为大肠埃希菌，然后通过乳胶凝集或其他方法筛选 O157。阳性培养物应转到适当的公共卫生实验室进行确认试验。该方法的局限性为 SMAC 琼脂培养基通常只能检出 O157 分离株，而非 O157 菌株因发酵山梨醇和乳糖而无法检测（已报道一些例外）[141]。

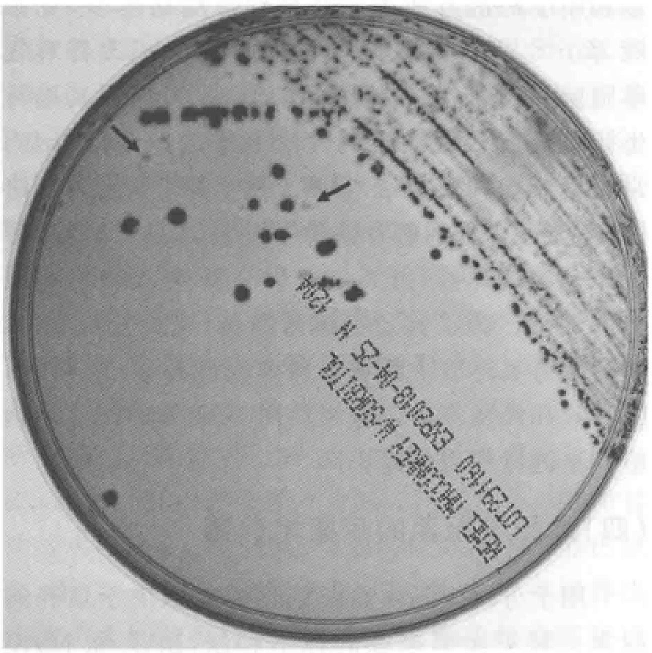


图 39-1 含有山梨糖醇的 MAC 琼脂培养基，其接种显示无色生长的大肠埃希菌 O157 分离株（黑色箭头）和发酵山梨糖醇的大肠埃希菌分离株（粉红色菌落）。大多数非 O157 STEC 分离株以粉红色菌落形式生长，见彩插

非 O157 菌株的鉴定比较困难，因为它需要对 SMAC 琼脂上显示大肠埃希菌菌落形态的粉红色分离株进行进一步检测。富集肉汤中生长的 Stx1-和 Stx2-阳性菌，若不能在 SMAC 琼脂上产生无色菌落，表明可能是非 O157 STEC，这可能促使实验室对粉红色菌落进行进一步检测。这些从肉汤中分离生长良好的菌落应检测 *stx*1 和 *stx*2，然后检测特异性抗 O 血清，或将肉汤提交给适当的公共卫生机构进行进一步检测。最常见的非 O157 血清群为 O26、O103、O121 和 O111，并随地理位置而变化[157]。所有可能的 STEC 分离株应被送往公共卫生实验室进行进一步的鉴定，并向全国发布。

为了简化实验室工作流程并提高检测效率，开发了用于分离 STEC 的显色琼脂培养基。CHROMagar 的 STEC 培养基（CHROMagar Microbiology，Paris，France）能够检测若干血清型，包括 O157、O26、O45、O103、O111、O121 和 O145，形成淡紫色的菌落可将 STEC 血清型与其他微生物群区分开来。使用特异性分离株和粪便培养物评估显色培养基的研究表明，该方法的敏感性和特异性为 85%～100%[158]。发酵山梨醇的菌株在这种培养基上难以生长[158]。共观察到 48 个假阳性菌落，这表明验证性试验应在所有淡紫色的菌落中进行。目前也有 O157 特异性的显色琼脂培养基（BBL CHROMagar；Becton Dickinson，Franklin Lakes，NJ），与 SMAC 相比，检测敏感性为 96.3%[159]。

除 STEC O157（ETEC、EPEC、EIEC 和 EHEC）之外的致泻性大肠埃希菌的分离和保存通常不在临床实验室进行，而是在疫情暴发期间送至参考实验室处理。在疑似疫情暴发的情况下，实验室应在非选择性的斜面培养基上分离 5～20 个菌落，其中大部分是乳糖发酵菌落，还有一些非发酵菌落。斜面培养基可提交给公共卫生实验室或参考实验室进行分子鉴定，以确定分离株是否为 ETEC、EPEC、EIEC 或 EHEC。分离株也可以在−80℃下于 15%～50%甘油培养基中长期冷冻保存。

（五）沙门菌和志贺菌的琼脂培养基

几种选择培养基可用于粪便标本中沙门菌和志贺菌分离。常见的培养基包括 HE（Hektoen enteric）琼脂、沙门菌-志贺菌（Salmonella-Shigella，SS）琼脂和木糖-赖氨酸-脱氧胆酸盐（xylose-lysine-deoxycholate，XLD）琼脂。HE 琼脂作为一种选择性琼脂，其含有胆盐可抑制革兰阳性菌的生长。还含有更多的蛋白胨（12g，而 MAC 琼脂培养基中为 3g），以及溴百里酚蓝、酸性品红（酸碱指示剂）和 2 个 H_2S 指示剂。蛋白胨的增加抵消了胆盐和指示剂的抑制作用[146]。沙门菌和志贺菌菌落呈绿色到蓝绿色，沙门菌属由于产 H_2S 而含黑色中心。变形杆菌在生长过程中可能与沙门菌或志贺菌存在相似处，故需要对其进行鉴别。SS 琼脂的组成与 HE 琼脂相似，可以检测沙门菌和

志贺菌。基本原理是乳糖发酵(琼脂变红),包括沙门菌和志贺菌在内的非发酵菌呈半透明状。产 H_2S 的沙门菌可以很快被鉴定出来,因为这些菌落在SS琼脂上生长时,菌落中心有一个黑点。SS琼脂培养基相对于MAC增加了蛋白胨的含量,也增加了煌绿,它可以抑制革兰阳性细菌并减少变形杆菌的聚集[146]。SS琼脂还含有硫代硫酸钠和柠檬酸铁,以检测沙门菌产生的硫化氢。SS琼脂培养基具有很强的选择性,能抑制部分志贺菌的生长。XLD琼脂培养基利用木糖和赖氨酸进行发酵反应。除志贺菌外的大多数肠道菌可以发酵木糖,沙门菌代谢产生的赖氨酸脱羧作用将琼脂转化为产碱[146]。XLD琼脂培养基还含有硫代硫酸钠和柠檬酸铁铵,用于检测硫化氢的生成。沙门菌和志贺菌在XLD琼脂上呈红色,产 H_2S 的沙门菌中心为黑色。

为评价琼脂培养基从粪便中分离沙门菌和志贺菌的能力,进行了一项研究,通过直接接种和富集培养检测了1597份粪便样本。先将样品加入至GN肉汤或Selenite-F肉汤富集培养,然后再接种至XLD、HE或SS琼脂培养基上。通过富集将沙门菌和志贺菌的分离率提高了近一倍。对比各类琼脂平板发现,XLD培养基对沙门菌和志贺菌的检出率最高(沙门菌为83%,志贺菌为90%),其次是HE琼脂培养基(沙门菌和志贺菌均为80%)和SS琼脂(沙门菌为74%,志贺菌为68%)[160]。该作者还观察到,HE和SS琼脂培养基假阳性菌落的数量是XLD琼脂培养基的2倍。

为了提高沙门菌的分离能力,许多制造商开发了用于分离沙门菌的显色琼脂培养基。表39-6列出了常用的显色琼脂培养基。有研究比较了3种不同的显色琼脂培养基与传统培养基(XLD、SS和HE琼脂培养基)的差异[161]。对1339份粪便的检测结果显示,在一种或多种培养基上鉴定出32株沙门菌。培养48 h后显色琼脂培养基的敏感性为78%~88%。沙门菌BBL CHROMagar (BD,Franklin Lakes,NJ)是最敏感的显色琼脂培养基,其敏感性为88%,而XLD琼脂培养基的敏感性为97%[161]。该作者认为沙门菌BBL CHROMagar和XLD富集粪便效果最佳,2种方法联合对标本中沙门菌的分离率为100%。目前,尚无志贺菌的显色琼脂培养基。

(六)STEC的粪便毒素测试

有研究表明,单纯依赖SMAC会导致28% STEC未被报道[162]。为了提高对STEC的鉴定能力,美国CDC建议实验室使用EIA或分子检测法进行毒素检测,并且对粪便或肉汤富集物(GN肉汤或MAC肉汤)直接检测,可提高敏感性。市面上有几种已通过美国FDA批准的抗原检测试剂盒。在不同的研究中,免疫测定法的总体敏感性各不相同,取决于试验中使用的金标准。有研究表明,对于生物浓度检测限,免疫测定法在粪便中可检测最低浓度为 10^4 CFU/ml,当粪便培养中STEC的浓度为 10^5 和 10^6 CFU/ml时,检测敏感性为75%[163]。单用抗原检测并不足以检测所有STEC阳性标本。一项将免疫测定法与SMAC培养法相比较的研究显示,后者能鉴定出另外11%的STEC阳性粪便[162]。这些数据表明,可以使用EIA与SMAC培养法相结合的鉴定方法;然而,EIA和培养相结合仍然可能漏报STEC,因最近综合了分子检测方法进行了评估,结果表明,存在分子测定阳性而培养阴性的标本(参见“粪便核酸扩增试验”)[164]。

(七)EPEC、ETEC、EAEC、EIEC的毒力检测与鉴定

EPEC、ETEC、EAEC和EIEC的检测一般是在感染Hep-2或HeLa细胞后通过分子鉴定或使用DNA探针进行的[165]。细胞培养的检测方法:将铺满的单层细胞用一定浓度的纯菌株感染1 h,然后进行洗涤以去除未黏附在细胞上的细菌,最后,加入靶向EPEC、EIEC、EAEC或ETEC的探针。对于ETEC的特异性检测,可以使用靶向ST和LT的商品化EIA[166]。这种分析和毒力检测在临床实验室并不常见,如果有临床表现,可以将标本送至公共卫生实验室或其他参考实验室进行检测。

七、鉴定

(一)埃希菌属的鉴定

生长在BAP上的埃希菌属菌落除赫氏埃希菌和伤口埃希菌含有黄色色素外,其余均为灰色大菌落,无色素沉着(表39-1)[19]。表39-1总结了

该菌属细菌常见的生化反应。大多数菌株不溶血;然而,一些菌株,特别是那些可引起 UTI 的菌株会产生 β-溶血。除了部分赫氏埃希菌(占分离株 45%)和伤口埃希菌(占分离株 15%)外,大多数菌株在 MAC 琼脂上是粉红色[19]。除了 O157 和阿尔伯蒂埃希菌生物群 2 外,大多数埃希菌属细菌在 SMAC 板上都可观察到山梨醇发酵现象。

生化反应中,埃希菌属细菌均为触酶阳性,氧化酶阴性,几乎都可以发酵 L-阿拉伯糖和 L-甘露醇(表 39-1)。大多数大肠埃希菌分离株吲哚阳性,发酵乳糖和木糖,并含有赖氨酸脱羧酶。在三糖铁琼脂上,埃希菌属细菌发酵葡萄糖和乳糖,产生酸性物质(用"A"表示"酸"),在顶部和底部显示黄色(用"A/A"表示),并产生气体(推动琼脂)。在某些情况下,细菌不能发酵乳糖,导致红色色素沉着("K"表示"碱性")表示为 K/A,并产生气体。其他的埃希菌属细菌(阿尔伯蒂埃希菌、蟑螂埃希菌、弗格森埃希菌、蟑螂埃希菌及伤口埃希菌)在生化上具有惰性,通常不产吲哚,无动力,不代谢乳糖(表 39-1)。

手工生化板,如 RapID(Remel,Lenexa,KS)和 API(the Analytical Profile Index)条(bioMérieux,Marcy l'Étoile,France),可以准确鉴定大肠埃希菌;然而,这些系统鉴定非典型菌株受到局限,因为生化试剂的变化可导致鉴定错误。由于阿尔伯蒂埃希菌对底物利用率极低,使用这些手工生化板鉴定这些菌株可能比较困难。一项研究报道,API 20E 会将阿尔伯蒂埃希菌鉴定为低分辨的大肠埃希菌[36]。

目前有几种可用的商品化自动鉴定系统被实验室广泛应用,且无须人工解读。在 3 个独立的研究中,O'Hara 和 Miller 使用美国 CDC 保存的菌株评估了其中 3 个系统,即 VITEK 2(bioMérieux,Inc.,Durham,NC)、MicroScan(Dade Behring,Inc.,West Sacramento,CA)和 Phoenix(Becton Dickinson Co.,Sparks,MD)[167-169]。在这些研究中,检测了 60 株埃希菌属细菌(30 株大肠埃希菌及弗格森埃希菌、赫氏埃希菌和伤口埃希菌各 10 株);其中,MicroScan 有 4 株细菌鉴定错误,Phoenix 和 VITEK 2 分别有 1 株细菌鉴定错误。总之,上述系统对埃希菌属细菌的鉴定非常准确[167-169]。但这些系统的数据库不包含阿尔伯蒂埃希菌,故这个菌种会被报告为哈夫尼亚菌、沙门菌、大肠埃希菌或鲁氏耶尔森菌[1,34]。值得注意的是,许多志贺菌属和沙门菌属细菌会被误鉴定为大肠埃希菌。

近年来,MALDI-TOF MS 因其鉴定成本低、鉴定周期短、准确性高等优点而被广泛应用。通过测定分离株中存在的特定蛋白峰(大多数为核糖体)的强度来进行鉴定。目前用于细菌鉴定的常见商用系统有 2 种,即 Bruker Biotyper CA(Bruker Daltonics Inc.,Billerica,MA)和 VITEK MS(bioMerieux,Inc.)。这 2 种仪器对大肠埃希菌菌株的鉴定准确性很高,虽然在数据库中存在其他埃希菌属细菌,但鉴定结果的可信度不高。利用 VITEK MS 进行的一项研究表明,对大肠埃希菌的鉴定正确率为 100%($n=65$),而对弗格森埃希菌和赫氏埃希菌的鉴定正确率分别为 66.7% 和 85.7%($n=6$ 和 $n=7$)[170]。由于志贺菌属细菌与非活性大肠埃希菌亲缘关系密切,故 MALDI-TOF MS 无法使用目前被美国 FDA 批准的数据库对 2 种细菌进行区分。对已经确定的特定生物标记峰进行研究,可能有助于区分两者之间的 MALDI 波谱;在 130 个分离株中,90% 被成功鉴定到种水平,只有 3% 的分离株被错误鉴定[171]。

(二)志贺菌属的鉴定

志贺菌在生化反应上与 EIEC 相似,与非活泼大肠埃希菌菌株的生长特性相似(表 39-1)[172-173]。志贺菌呈大的灰色菌落,通常有边缘或羽状边缘,在血琼脂上无色素。菌落在 MAC 琼脂培养基上表现为不发酵乳糖,以及氧化酶阴性、触酶阳性、无动力和不溶血[172-173]。在三糖铁琼脂培养基上,表现为 K/A 和不产气。因种内变异大,仅利用生化反应难以进行区分。表 39-1 列出了常见的生化反应,有助于区分,但由于相似性,志贺菌难以和非活泼大肠埃希菌区分。

通过生化试验可以鉴定出宋内志贺菌和痢疾志贺菌。宋内志贺菌吲哚阴性并存在鸟氨酸脱羧酶;然而,吲哚本身并不是一个理想的鉴定菌株的指标,其他志贺菌中只有 37%~42% 产生吲哚(表 39-1)[172-173]。痢疾志贺菌的特点是不利用 D-甘露醇。福氏志贺菌和鲍氏志贺菌在表型检测中难以区分,需要借助血清学分型加以鉴别。

由于其生化反应有限,快速表型鉴定系统如人工读板条(API 条)或自动化仪器很难进行可靠鉴定,非典型菌株常常鉴定错误。在上述"埃希菌

属鉴定"中提及的 O'Hara 研究结果显示，在 3 种自动化表型系统上检测了 10 株志贺菌，包括 4 种最常见菌种，最终正确地鉴定出 50%～70% 的分离株[167-169]。在 3 种仪器的错误鉴定包括 5 株志贺菌被鉴定为大肠埃希菌，1 株痢疾志贺菌被鉴定为巴斯德菌，1 株福氏志贺菌被鉴定为伤寒沙门菌，2 株未被鉴定。根据生化结果，大多数错误鉴定报告具有"良好"的置信值。

(三)沙门菌属的鉴定

沙门菌菌落无明显特征，类似于肠杆菌科其他成员的菌落，表现为不透明或半透明的白色大菌落。沙门菌在血琼脂不溶血，但对流产沙门菌和鸡沙门菌表现出弱溶血[174]。在 MAC 琼脂上分离出的沙门菌无色，除副伤寒沙门菌外，其他菌株都产 H_2S。所有沙门菌均为氧化酶阴性和触酶阳性[19]。在三糖铁琼脂上，沙门菌是 K/A 和产气。种和亚种可由表 39-5 和表 39-7 中所列的生化反应进行鉴定。区分沙门菌血清型的重要生化特性是在三糖铁中产气（伤寒沙门菌为阴性）和鸟氨酸脱羧酶阳性（伤寒沙门菌阴性，副伤寒沙门菌阳性）[19]；然而，该属生化反应多样，可能出现许多非典型菌株，使鉴定变得困难。表型鉴定通常与血清分型结合进行菌种确认。

表 39-7 鉴别沙门菌种和亚种的表型特征[a]

菌种或亚种（测试菌株数）	反应										
	己六醇	乳糖	ONPG	水杨苷	山梨醇	半乳糖醛酸	丙二酸	半乳糖二酸盐	KCN 生长	明胶（条）	L(+)-酒石酸（d-酒石酸[j]）
肠沙门菌 Ⅰ(650)	+	−	−	−	+	−	−	+	−	−	+
肠沙门菌 Ⅱ(146)	+	−	−[f]	−	+	+	+	+	−	+	−
肠沙门菌 Ⅲa(120)	−	−[c]	−	−	+	−	+	+	−	+	−
肠沙门菌 Ⅲb(155)	−	−[d]	−	−	+	+	+	−[i]	−	+	−
肠沙门菌 Ⅳ(120)	−	−	−	+[h]	+	+	−	−	+	+	−
肠沙门菌 Ⅵ(9)	d[b]	d[e]	d[g]	−	−	+	−	+	−	+	−
邦戈尔沙门菌(16)	+	−	+	−	+	+	−	+	+	−	−

注：[a]在 37℃下温育后的反应。+. 1～2 天内 90%（或更多）的菌株呈阳性；(+). 3 天或更长时间的阳性反应；−. 在 7 天内无反应（90%或更多）；d. 不同的反应[+,(+),−]；ONPG. o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside，邻硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷。在发布者许可下改编自参考文献[263]。[b]总共有 67% 呈阳性。[c]总共有 15% 呈阳性。[d]总共有 85% 呈阳性。[e]总共有 22% 呈阳性。[f]总共有 15% 呈阳性。[g]总共有 44% 呈阳性。[h]总共有 60% 呈阳性。[i]总共有 30% 呈阳性。[j]酒石酸钾钠[263]

与志贺菌鉴定相似，快速表型检测可以鉴定沙门菌，但与鉴定大肠埃希菌相比，敏感性较低。O'Hara 的研究结果显示，沙门菌的鉴定在三者中最不可靠，可能是由于菌株的多样性。使用 VITEK 2 进行检测发现，有 4 株乳糖阳性沙门菌被报告为大肠埃希菌，置信值显示"非常好"[169]。使用 MicroScan，发现有 5 个错误鉴定，其中 4 个被鉴定为大肠埃希菌、志贺菌或勒米诺菌属，可能性>90%[167]。在 Phoenix 中共观察到 7 个错误鉴定，其中还包括另外 18 个新菌株（非美国 CDC 库）。其中 6 例为大肠埃希菌，1 例为宋内志贺菌[168]。制造商测试了 5 株细菌，80% 的结果与传统底物的结果一致，但仍然存在错误鉴定。仅 1 株菌被误鉴定为沙门菌，所以阳性结果有很高的预测值。总之，这些系统的敏感性很高，但由于从粪便中分离出来的菌株的生化反应具有可变性，需要进行后续的生化测试来确认。此外，沙门菌和志贺菌的分离株应该被送到公共卫生机构进行检测。如果结果不一致（如 MAC 琼脂上的无色大肠埃希菌），应在报道前向上级或主管提交其他的生化检测结果。

对美国 FDA 批准的 MALDI-TOF MS 库及 MALDI-TOF MS 体外诊断库进行的评估表明，沙门菌可准确地鉴定到属水平[175-176]。目前，Bruker 生物标本库不能很好地区分血清型，故建议在患者需要护理时对这些菌株进行后续血清分型。将来可能对库进行的更新，通过测量特定的 m/z 峰值来区分细菌；然而，这些应用仍处于研究阶段[177-178]。VITEK MS 数据库已被许可对沙门菌属细菌进行区分，而且在一项研究中，VITEK

正确地鉴别出了测试的 5 种伤寒血清型中的 3 种，但是制造商仍然建议使用血清试验确认[179]。

(四)粪便核酸扩增试验

核酸扩增和检测方法已被用于鉴定致病性大肠埃希菌、沙门菌和志贺菌，以及其他与急性和长期胃肠炎相关的细菌、病毒和原生动物制剂。已开发出几个美国 FDA 批准的多重分子鉴定板，能够检测 3～22 个靶标(表 39-8)。既有用于鉴定沙门菌、志贺菌、弯曲菌和编码志贺毒素(*stx*1 和 *stx*2)的窄谱或靶向鉴定板，也有针对多种细菌、病毒和原生动物病原体的广谱鉴定板。这些检测板包括从需要脱机提取和手动设定的单个实时 PCR 的高复杂度操作，到能在约 1 h 内直接从样本到结果的中等复杂度操作平台。

表 39-8 美国 FDA 批准的多重 NAATs，用于检测大肠埃希菌、沙门菌和志贺菌[a]

类型和检测	靶细菌	自动化	技术	通量	运行时间(h)	费用/测试
胃肠道						
BD MAX EBP	4 种细菌：沙门菌、志贺菌/EIEC、空肠弯曲菌/大肠弯曲菌、*stx*1/*stx*2	样品到结果	实时荧光定量 PCR	每批最多 24 个标本	3	$
Hologic ProGastro SSCS	5 种细菌：沙门菌、志贺菌/EIEC、空肠弯曲菌/大肠弯曲菌、*stx*1/*stx*2	离线提取、手工设定 PCR	实时荧光定量 PCR	批次受限于热循环的能力	3	$ $
Luminex Verigene EP	7 种细菌：沙门菌、志贺菌/EIEC、弯曲菌、*stx*1/*stx*2、弧菌、小肠结肠炎耶尔森菌 2 种病毒：诺如病毒 GⅠ/GⅡ、轮状病毒 A	样品到结果	实时荧光定量 PCR 和固态微阵列	根据需求	2	$ $ $
Luminex xTAG GPP	8 种细菌：沙门菌、志贺菌/EIEC、弯曲菌、霍乱弧菌(*ctx*)、*stx*1/*stx*2、大肠埃希菌 O157、艰难梭菌(*tcdA*/*tcdB*)、ETEC(LT/ST) 3 种病毒：腺病毒 40/41、诺如病毒 GⅠ/GⅡ、轮状病毒 A 3 种寄生虫：蓝氏贾第鞭毛虫、隐孢子虫、线虫	离线提取、手工设定 PCR 自动杂交与液相阵列检测	实时荧光定量 PCR 和液态微阵列	每批最多 24 个标本	5	$ $ $
BioFire FilmArray GI	13 种细菌：沙门菌、志贺菌/EIEC、空肠弯曲菌/大肠弯曲菌/乌普萨拉弯曲菌、霍乱弧菌/副溶血性弧菌/创伤弧菌、霍乱弧菌(*ctx*)、小肠结肠炎耶尔森菌、类志贺邻单胞菌、艰难梭菌(*tcdA*/*tcdB*)、*stx*1/*stx*2、大肠埃希菌 O157、EAEC、EPEC、ETEC(LT/ST) 5 种病毒：腺病毒 40/41、星状病毒、诺如病毒 GⅠ/GⅡ，轮状病毒 A、札幌病毒 4 种寄生虫：隐孢子虫、卡耶塔环孢子虫、溶组织内阿米巴、蓝氏贾第鞭毛虫	样品到结果	巢氏 PCR	根据需求	1	$ $ $ $

(续 表)

类型和检测	靶细菌	自动化	技术	通量	运行时间(h)	费用/测试
血培养						
Luminex Verigene GN	9种细菌：大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、铜绿假单胞菌、黏质沙雷菌、不动杆菌属、柠檬酸杆菌属、肠杆菌属、变形杆菌属	样品到结果	固态微阵列	根据需求	2	$ $ $
BioFire FilmArray BC	19种细菌：鲍曼不动杆菌、流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌、铜绿假单胞菌、一些肠杆菌、阴沟肠杆菌复合群、大肠埃希菌、产酸克雷伯菌、肺炎克雷伯菌、变形杆菌属、黏质沙雷菌、肠球菌属、单核细胞性李斯特菌、金黄色葡萄球菌、葡萄球菌属、链球菌属、无乳链球菌、化脓链球菌、肺炎链球菌 5种酵母菌：白色念珠菌，光滑念珠菌，克柔念珠菌，近平滑念珠菌，热带念珠菌	样品到结果	巢氏PCR	根据需求	1	$ $ $ $
Accelerate PhenoTest BC kit	14种细菌：大肠埃希菌、克雷伯菌属、肠杆菌属、变形杆菌属、柠檬酸杆菌属、黏质沙雷菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌、路邓葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、链球菌属 2种酵母菌：白色念珠菌，光滑念珠菌	样品到结果	FISH和显微镜(自动化)	根据需求	1个ID,7个AST	$ $ $ $
AdvanDX	3种细菌(革兰阴性)：大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌	样品到结果	FISH和显微镜(手工)	根据需求	1	$
HemoFISH	6种细菌：大肠埃希菌、一些肠杆菌科细菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、葡萄球菌属、链球菌属	样品到结果	FISH和显微镜(手工)	根据需求	1	$
脑膜炎						
BioFire FilmArray ME	6种细菌：大肠埃希菌K1、流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌、单核细胞性李斯特菌、无乳链球菌、肺炎链球菌 7种病毒：巨细胞病毒、肠道病毒(Enterovirus)、HSV-1、HSV-2 HHV-6、VZV、人副肠孤病毒(human arechovirus) 1种真菌：新型隐球菌/格特隐球菌	样品到结果	巢氏PCR	根据需求	1	$ $ $ $

注：[a] AST. 抗菌药物敏感性试验；FISH. 荧光原位杂交；HHV. 人疱疹病毒；HSV. 单纯疱疹病毒；ID. 鉴定；VZV. 水痘-带状疱疹病毒

与常规培养和富含肉汤的 EIA 方法相比，临床试验和独立评估一致证实所有分子平台具有高敏感性。具体来说，对沙门菌的敏感性为 82.7%～100%，对志贺菌的敏感性为 95.9%～100%，对包括大肠埃希菌血清型 O157 在内的 STEC 的敏感性为 93.7%～100%[65,180-182]。重要的是，这些研究还报道，在大量粪便标本中核酸扩增试验(NAAT)能鉴定出病原体，但这些粪便在常规培养和(或)EIA 报告为阴性。该方法使沙门菌阳性率增加 19%～66%，志贺菌阳性率增加 40%～58%，STEC 菌(包括大肠埃希菌血清型 O157)的阳性率增加 15%～100%。检出率的增加与培养/EIA 和 NAAT 的检出限的 1～2 $\log_{10}$ 差异直接相关。Anderson 等[163]使用美国 FDA 批准的 NAAT 法报道了在粪便中细菌浓度为 10^5 CFU/ml 浓度时，对沙门菌、志贺菌和 STEC O157 的敏感性为 100%；在 10^4 CFU/ml 浓度时，敏感性为 69%～100%。与培养方法形成对比，培养法仅在细菌浓度为 10^7 CFU/ml 时，对以上 3 种菌的敏感性为 100%。在 10^6 CFU/ml 时，对 STEC O157 的敏感性下降至 75%，3 种细菌在 10^5 CFU/ml 时的敏感性均≤81%[163]。使用肉汤富集后再进行 Stx 特异性 EIA 检测，与直接在原始或保存的粪便上进行 EIA 相比，敏感性增加；然而，与在原始标本(即没有富集)上进行的 NAAT 相比，这种方法敏感性只有 29%～74%[164,183]。

周转时间取决于每个测试的自动化程度，从手工测试的 8 h 到全自动测试的 1 h 不等。缩短发报告时间可能对患者管理和感染控制工作产生积极影响。对于非复杂胃肠炎，不建议经验性使用抗生素治疗；但处方中还是经常使用抗生素，这对儿童、3 个月以下的婴儿、严重腹泻者或患有全身性疾病的患者可能是合适的[184]。在这些情况下，具有高阴性预测值的快速检测能减少以病原学为目标的经验性抗菌治疗。快速鉴定 STEC O157 也是有益的，因为使用抗生素会增加 HUS 风险[185]。快速的结果还可以通过鉴定志贺菌或 STEC O157 阳性的患者来控制感染，这些患者即使在细菌含量较低的情况下也具有很强的传染性。

多重 NAAT 通常包括针对多种大肠埃希菌病原体的遗传靶标，包括 EPEC、EAEC 和 ETEC，这些靶标与培养中的非致病性大肠埃希菌分离株难以区分。多项研究报告称，这些大肠埃希菌病原体占所有阳性结果的 12%～24%，表明这些病原体可能是引起细菌性肠胃炎的病因，但其未被充分认识并且被低估[65-67,181]。独立实验室也开发了类似的用于鉴定其他致病性埃希菌属(包括阿尔伯蒂埃希菌和弗格森埃希菌)的多重试验，当使用常规培养和鉴定方法时，这些菌属可能无法检测到或被错误鉴定[186]。NAAT 阳性结果的临床解释受多种因素影响而变得复杂。首先，在多达 7%～23% 的无症状患者中鉴定出 EPEC 和 EAEC，提示存在携带或定植状态[69,71-72,77]。携带状态似乎在儿童中和病原体流行的区域更为常见；然而，在发达国家，对特定致病性大肠埃希菌的无症状携带尚未进行大规模研究。其次，在含有第 2(或第 3)种明确病原体如诺如病毒或弯曲菌的标本中，经常鉴定出 EPEC、EAEC 和 ETEC。3 项研究报告发现，45%～83% 的 EPEC、EAEC 和 ETEC 分离株是多种病原体或混合感染的一部分[65,67,181]。综上所述，这些大肠埃希菌的致病性不确定及对非复杂性急性胃肠炎不推荐进行治疗，使人们对临床是否需要广泛地使用 NAAT 鉴定平台产生了质疑。

应用分子诊断急性胃肠炎的主要考虑因素是检测成本，以及患者或保险人的相关成本较高。对于没有复杂胃肠炎和全身症状的门诊患者，昂贵的广泛分子检测板在临床的必要性受到质疑。撰写本文时，还没有大规模的研究考察分子检测板对抗生素管理、患者结局或整体护理成本的影响。目前，感染性腹泻诊断指南推荐一种选择性和针对性的方法，包括基于已知的暴露、危险因素和这些病原体相关的临床症状，仅检测沙门菌、志贺菌、弯曲菌、耶尔森菌、包括血清型 O157 的 STEC 和艰难梭菌[184]。在这些情况下，窄谱而靶向的 NAAT 检测板将提供比粪便培养更快速和更敏感的检测方法，并且在考虑常规粪便培养和微生物鉴定所需的培养基和人力时，实验室的成本可能不会增加[187]。对于轻微的急性胃肠炎或持续<14 天的旅行者腹泻，除非患者有严重疾病的风险，不建议常规进行诊断检测[184,188]。对于持续腹泻(>14 天)、发热、白细胞增多、旅行史、婴儿和免疫功能低下的患者，可以考虑更广泛的病原体鉴别，包括寄生虫和罕见细菌性病原体[184,188]。对于这些患者，使用广泛检测板检测方法可能是

作为综合检测策略的一部分。由于NAAT无法区分活菌和死菌，因此不鼓励使用NAAT对症状已得到缓解的患者进行随访或"治愈试验"。对于某些特定人群，包括食品处理人员、医护人员和返回儿童保育机构的儿童，粪便培养阴性即被认可其传播低风险[184]。

非培养技术的NAAT等诊断测试的意外后果是对公共卫生和流行病学工作产生了负面影响。菌株的收集对感染暴发的调查和新出现的细菌性胃肠炎血清型的鉴定至关重要。此外，无培养分离株就无法进行抗菌药物敏感性试验，而药敏试验应该用来指导靶向治疗和监测不断变化的耐药模式。因此，即使当NAAT作为支持公共卫生和监测目标的临床试验方法时，也建议对所有粪便标本进行常规细菌培养[184]。

(五)非粪便标本的NAAT和抗原检测

几种非粪便标本的NAAT可用来检测大肠埃希菌，包括血液和脑脊液中微生物的检测。这些检测的列表见表39-8。因为大肠埃希菌与其他埃希菌属细菌或志贺菌属细菌具有密切的遗传亲缘关系，所以根据检测引物的设计，它们之间可能会发生交叉反应[142]。例如，分子测定不能区分EIEC和志贺菌属细菌[26,65]，在使用时应该参考包装说明书来确定潜在的限制。总之，在样本检测中，分子检测与生化鉴定的一致性大于95%[189]。

利用抗原或NAAT快速检测脑脊液中的大肠埃希菌，有助于患者的治疗。但乳胶凝集试验和其他基于抗原的试验敏感性较差，严重限制其临床应用。评价抗原检测的研究表明，与革兰染色和培养法相比，抗原检测的敏感性为66%～80%[19,191]。总之，这些数据表明，抗原检测不能指导临床实践，假阴性风险可能会导致延迟治疗和浪费医疗成本[190]。因此，临床实验室已不再常规进行此类检测。CSF分子检测有望缩短检测周期，提高敏感性。一种商业化的检测方法，FilmArray脑膜炎/脑炎检测平台(BioFire，Salt Lake City，UT)，能够在1 h内检测包括K1型荚膜大肠埃希菌在内的14种靶细菌[56]。表达K1的大肠埃希菌增强了其穿过血脑屏障的能力，并导致80%～90%的新生儿脑膜炎[54]。该方法特异性地检测细胞毒性坏死因子1(*cnf*1)，对脑膜炎分离株和表达K1的大肠埃希菌有特异性，这也是该方法不能检测到非K1大肠埃希菌或其他埃希菌属细菌的原因[55,56]。

(六)测序在区分大肠埃希菌、志贺菌和沙门菌中的作用

对具有生化惰性而难以鉴定的分离株进行16S rRNA基因测序或全基因组测序(whole-genome sequencing，WGS)对实验室来说具有可行性。一项研究对72个少见革兰阴性杆菌进行了比较，结果显示，碳源利用率仅为87.5%，与16S rRNA测序一致[192]。然而，16S rRNA基因测序有其局限性，由于其基因序列的差异性<1%[193-194]，故不能用于区分EIEC和志贺菌。使用k-mers或特异性单核苷酸多态性分析进行精确鉴别的WGS方法给出了这些菌种之间的最佳区别[195-196]。

使用测序的实验室需要谨慎地进行生物信息学分析。公共数据库质量差，研究发现，5%～26%的基因序列包含大量的错误[197,198]。强烈建议使用管理良好的数据库，如参考序列(Reference Sequence，RefSeq)和Genome Reviews，以及商业数据库，如CosmosID。

八、分型系统

随着基于下一代测序(NGS)的方法的出现，以前主要基于抗原学方法的肠杆菌菌株分型策略近来经历了巨大的变化。NGS技术的广泛应用为医院、社区和食源性疾病暴发中流行病学重大意义的毒株的详细谱系研究和传播链的精细跟踪提供了可能。此外，公共中央跟踪系统的发展，如美国FDA的GenomeTrakr网络，其中对已测序的暴发基因组进行了排序和索引，使实时绘制疫情谱系的地理地图成为可能。本节首先介绍基于抗原分型、脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis，PFGE)和MLST的传统分类方案，然后介绍新的基于分子和NGS的方法，包括核糖体MLST(ribosomal MLST，rMLST)、全基因组和核心基因组MLST(wgMLST和cgMLST)，以及全基因组单核苷酸变异(single-nucleotide variant，SNV)的菌株追踪。

(一)抗原方法概述

抗原分型方法是利用抗体根据细胞或鞭毛表面暴露的蛋白质和碳水化合物化学基团的差异来区分菌株的分型方法。尽管现代技术能生产针对几乎任何抗原靶点的单克隆抗体,但多克隆抗血清仍被用于对大肠埃希菌、志贺菌和沙门菌进行血清学分型。经典分型方法所依据的两个抗原靶点是O(菌体)抗原和H(鞭毛)抗原。O抗原通常由2~7个糖残基的10~25个重复单位,构成线性、分支或双分支的拓扑结构,形成细菌膜中脂多糖的最外层[199]。O抗原的化学组成部分由大肠埃希菌、志贺菌和沙门菌[200]中 *rfb* 合成基因簇的基因产物决定,可实现抗原的多样性,目前抗血清已能区分数百种O抗原。在某种程度上,这种多样性是通过细菌O抗原中合成的大量不同糖合成而实现,包括戊糖、脱氧己糖、乳糖取代己糖、庚糖和壬酮糖[199]。相反,H抗原本质上是蛋白质,存在于细菌鞭毛蛋白亚基中,有动力的大肠埃希菌和沙门菌中出现。这些菌的 *fliC* 和 *fliB* 基因(后者主要在双相性沙门菌中)序列的变异决定了血清H抗原[201-204]。沙门菌分型系统附加了一个Vi荚膜抗原以区分伤寒沙门菌和非伤寒沙门菌[205]。

尽管血清分型被认为是金标准,但此方法较昂贵,需要专门的技术知识及保存数百种抗血清[201,206]。此外,这些方法可能在抗原表达量低的情况下或在出现尚没有开发抗血清的新基因组合的情况下无法提供明确的鉴定[200]。考虑到这些因素,须将WGS分型方案与传统血清型联合或通过开发新的WGS分型系统提供一种更快速和标准化的分型方法。下面将分别讨论这些方法。

(二)大肠埃希菌抗原分型

埃希菌属内的抗原分型主要用于大肠埃希菌,除O157:H7型菌株的鉴定外,血清分型通常局限于公共卫生实验室使用。虽然大肠埃希菌中可能的O、H抗原组合的数量非常大,但实际上,致病菌株中只有相对较少的抗原亚型(表39-2)。虽然在许多公共卫生实验室中不常规做,但在某些情况下,要进一步对K(荚膜)抗原进行分型。商业试剂盒可用于O157:H7菌株分型,另外可直接通过免疫法测定志贺毒素或通过PCR扩增毒素基因,对这种血清分型方法进行补充完善。目前,通常采用分子技术对暴发的O157:H7菌株进行分型,具体方法如下所述。

(三)志贺菌抗原分型

如本章所述,通过传统的生化、表型、MALDI-TOF MS和16S rRNA基因测序等方法,很难或不可能将志贺菌与不活泼大肠埃希菌区分开来。此外,无动力的志贺菌菌株通常不表达鞭毛蛋白,故不能进行H抗原的血清分型。因此,除了志贺菌的亚分类外,O抗原血清分型通常对志贺菌与大肠埃希菌的最终鉴别至关重要。通常利用混合抗血清进行血清分型,然后根据需要进行单独检测。最近的研究表明,用WGS数据预测福氏志贺菌经典的O抗原血清型准确率>90%[207]。

(四)沙门菌的抗原分型

沙门菌属按O型、H型和Vi型抗原分类,血清型按White-Kauffmann-Le Minor(WKL)方案进行分类[205,208-209]。该方案定义了超过2500个血清型,其中大多数引起人类疾病的血清型属于肠沙门菌肠炎亚种[206]。分型通常从O抗原抗血清开始,因为O血清群的测定足以确认分离株属于沙门菌属。根据确切的方法,O抗原群依次在反应池中进行检测,然后用单个抗血清进行检测。O抗原群最初是用字母表示的,随后每个O抗原都被单独编号。虽然在WKL方案抗原规则中使用了数字,但许多分型实验室仍然用字母来表示O抗原群。

O抗原测定后,再利用H抗原分型。沙门菌属在肠杆菌科中是不寻常的,因为许多沙门菌的血清型分别编码两种鞭毛蛋白,即H1和H2,分别称为第1相和第2相抗原[210-211],而能够在2种鞭毛蛋白表达之间进行切换的菌株称为双相菌株。只表达一种H抗原的菌株被称为单相菌株,最常见的是伤寒沙门菌和肠沙门菌。罕见的无动力菌株可能不表达任何可检测的H抗原[206]。不同部位的鞭毛蛋白分别由用于分型的抗血清中的不同抗体所识别,从而定义了多个H1或H2抗原决定簇同时存在于单个鞭毛蛋白中。因此,可以对H抗原群的每种相进行多个抗原分配,这些分配由抗原规则中的数字来区分。目前已知,在大多数沙门菌分离株中,第1相H抗原由 *fliC* 基因编码,第2相H抗原由 *fljB* 基因编码[202,211]。第3种用于沙门菌分型的抗原是Vi抗原。沙门菌的

Vi抗原由 *viaA* 和 *viaB* 基因座控制，这些基因组主要存在于伤寒沙门菌中，但需要注意的是，Vi抗原也在一些枸橼酸杆菌属分离株中表达[212]，故应先用其他方法排除柠檬酸杆菌属后再用Vi抗原初步分类。

沙门菌血清型在WKL方案中正式命名如下：亚种(space)O抗原，Vi抗原(如果存在)：1相H抗原：2相H抗原(如果存在)。隶属于亚种Ⅰ的血清型(肠沙门菌肠炎亚种)经常被命名，有超过1500个被命名的血清型[205]。按照惯例，这些血清型名称是大写而不是斜体。此外，当提到血清型的名称时，许多学者选择省略"肠炎亚种"这一名称，因为其他亚种没有名称，而仅用抗原规则来表示。由于沙门菌菌株通过多种机制主动交换遗传物质，因此出现了新的抗原组合，这些组合在WKL方案中不易归类[200]，下面将讨论处理这些菌株的分子方法。肠沙门菌肠炎亚种最常见的两种致病血清型是单相肠型(Ⅰ型血清型9,12:g,m:—)和双相型鼠伤寒(Ⅰ型血清型4,[5],12:i:1,2)[205]。

(五)传统的分子方法

上述抗原分型方法取决于是否有可用的抗原特异性抗血清。相比之下，下面讨论的分子方法的优点是，它是通用方法，不需要菌株特异性试剂。最广泛使用的经典分子方法之一是PFGE，尽管这种方法正在被WGS所取代。PFGE包括对分离株提取总DNA，进行限制性酶切，然后进行酶切片段的电泳分离。PFGE方法用于分离非常大的DNA片段，如果使用标准凝胶电泳，由于这些片段太大而没有足够的分辨率[213-214]。限制性内切酶识别位点的菌株之间的序列变异可改变酶切消化片段的数量和大小分布，特定菌种的片段大小的模式称为脉冲型。脉冲型已被广泛地用于大肠埃希菌、志贺菌和沙门菌，并用于跟踪疫情暴发，而PFGE是美国CDC脉冲网络(PulseNet)使用的金标准指纹识别方法。关于PFGE预测沙门菌经典抗原血清型能力的研究表明，根据分离株的多样性和所选的限制性内切酶，对脉冲型进行分类后，其预测准确率为75%～99%[206]。

与PFGE不同，MLST是一种基于测序的技术，它的工作原理是通过对特定菌种共有的一组核心基因(通常为7个)的序列变异进行索引[215]。每个具有新序列的核心基因的等位基因都被赋予一个唯一的编号，每个新的等位基因组合都被赋予一个唯一的序列类型。利用等位基因作为分析单位，而不是单核苷酸变异(SNV)，可方便地处理实际情况，即在一个连续的区域内引入多个核苷酸的变异作为单分子事件，就像重组或移动遗传元素插入一样[215]。MLST通常是通过PCR扩增目标基因，然后进行Sanger测序来进行检测分型，不过也可以从WGS组合中提取MLST等位基因序列。然后将这些序列与适当的分类方案进行比较，或者出现新的等位基因。MLST方案已被开发并用于超过100个属和种的分型鉴定，包括大肠埃希菌、志贺菌和沙门菌。对于沙门菌，MLST已被广泛地与经典的血清型分类进行比较，在标准的MLST方案中并非所有的血清型都可以作为独特的序列类型，但MLST仍具有一定的优势。与基于3、4、7个基因的MLST方案进行的比较研究表明，根据方案和分离株的不同，血清型预测准确率为88%～100%[206,216]。

(六)基于NGS的分型和流行病学

如上所述，WGS技术的广泛使用和大量可用的参考基因组为菌株分型和疫情跟踪提供了新的方法。WGS技术已成为在大肠埃希菌、志贺菌和沙门菌内部组织多样性的通用标准化系统，与经典的MLST方案一样，都是建立在<0.2%的基因组分析数据基础上。因此，传统的基于MLST的方法并不总是能够在克隆谱系中得出以流行病学为目的的区分[215]。对整个基因组的分析将提供了一个更完整的信息源，从中可以重建系统发育和对比菌株，而以等位基因为分析单位的MLST方法可以通过多种方式扩展到全基因组数据。这些方法包括rMLST、wgMLST和cgMLST，尤其在大肠埃希菌、志贺菌和沙门菌的菌株分型中起到了重要的作用。

rMLST方法是基于核糖体蛋白亚基 *rps* 基因的分析，在细菌中通常有53个 *rps* 基因。*rps* 基因在大肠埃希菌、志贺菌和沙门菌群中相对保守，但在克隆群之间提供了足够的多样性，为菌株分型方案提供了比传统的基于MLST分类更精细的分辨率[215,217]。*rps* 基因另一个优势是分布于整个基因组中，使得rMLST方案对局部重组事件相对稳健[215]。相比之下，wgMLST方案则分析给定分离株中的所有位点。这种方法最适用于共

享所有或几乎所有位点亲缘关系非常密切的分离株，通常针对的是克隆暴发的成员[215,217]。由于大多数细菌基因组结构是由一组在一个菌种或菌株之间常见的核心基因，加上在不同分离株之间可能不同的可变数量的辅助基因组成，因此开发了这种方法的衍生技术 cgMLST，它根据共享的核心基因含量对细菌分离株进行分类[215]。cgMLST 方法已被证明具有高度的可重复性，并已成功用于疫情跟踪和监测[218,219]。

上述 WGS MLST 的另一种替代方法是直接基于 SNV 的基因组比较。在这些方法中，通过比较分离株间基因组间的单核苷酸差异来构建系统发育和克隆谱系。这些方法中隐含的一个假设是，单个 SNV 代表独立的分子事件，所有位置的中性替代率是相等的。虽然这些假设通常并不完全正确，但在某些情况下，非独立 SNV(如由于移动遗传元素插入)和中性替代率的差异对疫情跟踪的影响可以忽略不计。高突变株克隆亲缘关系的测定可能会出现困难。建模技术可以纠正许多这些特性，但是超出了本章的范围。基于全基因组 SNV 的方法现已成功地用于大肠埃希菌、志贺菌和沙门菌疫情的流行病学分型和跟踪[220-223]。随着可用的基因组序列数量的不断增加，越来越多的临床和公共卫生实验室采用 WGS，基于 WGS 的分型的精细化和自动化程度越来越高，较老的抗原分型系统可能会被取代。

九、抗菌药物敏感性

(一)肠道外大肠埃希菌

由于耐药性越来越普遍，当从肠外培养出大肠埃希菌纯菌落(即一种潜在的病原体)或接近纯菌落(即 2 种或 3 种潜在病原体)时，进行药敏试验是必要的。大肠埃希菌对包括氟喹诺酮类和广谱头孢菌素(extended-spectrum cephalosporins, ESCs)在内的现有经验治疗耐药，已成为引起卫生保健和与社区相关的肠道外感染的重要原因[224]。导致这种耐药性的一个重要因素是大肠埃希菌克隆群 ST131 的传播，该克隆群目前是全球肠道外大肠埃希菌感染的主要菌群。ST131 分离株通常携带 $bla_{CTX-M-15}$ 或 $bla_{CTX-M-14/14-like}$ESBL 基因[225]。大肠埃希菌 ST131-H30 是 ST131 中最具流行病学意义的克隆亚群。由于染色体基因 *gyrA* 和 *parC* 的喹诺酮耐药性决定区(quinolone resistance-determining regions, QRDRs)存在点突变[227]，所以几乎所有的 ST131-H30 分离株都对氟喹诺酮类(指定的 H30R 亚克隆)耐药[22,226]。此外，这些分离株中还存在质粒介导的喹诺酮耐药性决定因素，包括 *aac*(6′)-*lb*-*cr* 和 *qnrB*1[226]。

在大肠埃希菌中还发现了由质粒编码的 AmpC β-内酰胺酶，但这种耐药机制并不常见。在 2011—2012 年，美国医院的 SENTRY 监测项目对大肠埃希菌进行了一项研究，评估了各种 β-内酰胺酶对 ESC 耐药性的贡献。在 120 例分离株中，49%携带 $bla_{CTX-M-15}$，22%携带 $bla_{CTX-M-14/14-like}$，14%携带 *cmy*2 AmpC 基因[228]。CMY-2 的地理分布最广泛，已经在其他肠杆菌中发现(Jacoby 综述[229])。

碳青霉烯酶属于 β-内酰胺酶，可以水解碳青霉烯类药物而产生耐药性，在大肠埃希菌中最常见的该类酶为肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶。有必要对患者体内定植的碳青霉烯类耐药肠杆菌进行碳青霉烯酶检测，以便采取隔离预防措施，防止其在卫生保健场所传播。检测这些酶的表型和基因型方法将在第 72 和第 79 章中讨论。

不同地区、不同感染类型和不同患者群体的肠外大肠埃希菌的药物敏感性差异很大。一般来说，有耐多药菌株感染病史的患者、住院患者、使用广谱抗生素和(或)到世界上耐多药率高的地区旅行的患者，有较高的耐多药大肠埃希菌感染风险[230]。引起 UTI 的大肠埃希菌越来越多地被检测出是对常用抗菌药耐药的多重耐药菌株。20 世纪 90 年代，对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑耐药的菌株在美国开始流行，且氟喹诺酮类药物的耐药率超过 10%[231]。在世界上许多地方，非复杂 UTI 患者中大肠埃希菌对氟喹诺酮类药物的耐药率>20%，复杂 UTI 患者中为 50%[232]。2010 年《泌尿道感染国际治疗指南》建议，在这种耐药率(即>10%)下，可以使用氟喹诺酮加初始剂量的另一种抗菌药物方案治疗肾盂肾炎，如果耐药率>20%，则不建议使用氟喹诺酮类药物治疗膀胱炎[233]。美国最近由大肠埃希菌引起的社区性肾盂肾炎的数据表明，36.4%的分离株对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑耐药，14.2%对头孢唑林耐药，7.7%对头孢曲松耐药，12.1%对环丙沙星耐药。除甲氧苄啶-磺胺甲噁唑外，复杂的肾盂肾炎患者

对所有抗菌药物的耐药率均显著升高。然而，重要的是，1/3感染产ESBL大肠埃希菌的患者没有多重耐药细菌感染的传统危险因素（即抗菌药物或医疗保健暴露史或国际旅行），强调了产ESBL菌株现在在美国一些社区流行的观点。

引起新生儿疾病的大肠埃希菌通常比导致老年人群疾病的菌株更敏感。最近对大肠埃希菌菌血症病例的研究发现，1岁以下患者对环丙沙星耐药率为8.3%，对ESC耐药率为5.1%，对哌拉西林-他唑巴坦耐药率为4.8%，对庆大霉素耐药率为7.3%，对碳青霉烯类药物耐药率为0%；所有其他年龄组的耐药率明显较高[234]。目前的实践指南推荐使用氨苄西林和庆大霉素联合治疗新生儿败血症；该方案覆盖了95%以上的新生儿大肠埃希菌分离株[235]，但在世界上一些地区，耐药率要高得多[236-237]。如怀疑脑膜炎，一般加用头孢噻肟；添加头孢噻肟可进一步覆盖大肠埃希菌。

如果使用现行CLSI和EUCAST[238]指南的药敏折点，则不需要再进行常规ESBL或碳青霉烯酶的检测（如果检测到ESBL，则将头孢菌素/氨曲南结果从敏感改为耐药；如果检测到碳青霉烯酶，则将头孢菌素/氨曲南/碳青霉烯结果从敏感改为耐药）。虽然临床数据很少，但药代动力学-药效学模型表明，预测这些药物治疗的临床反应的最佳指标是MIC而非耐药机制[239]。根据机构和地区的需求，CLSI和EUCAST都推荐将ESBL检测应用于流行病学研究。此外，能否根据ESBL检测结果来决定是否使用β-内酰胺类和β-内酰胺酶抑制剂组合治疗严重感染仍存在争议[240]。虽然机构能够以此为目的继续进行ESBL检测，但研究应结合当前应用的药敏折点。毫无疑问，ESBL检测并不能应用于所有分离株以确定是否存在这些酶（如在同时表达AmpC的菌株中是否存在ESBL）[241]。

2014年，CLSI修订了肠杆菌科细菌的头孢吡肟药敏断点，引入“剂量依赖型敏感”（susceptible-dose-dependent，SDD）来取代“中介”。（值得注意的是：所有关于肠杆菌科细菌药敏折点的讨论都遵循CLSI指南，该指南没有涉及命名法的改变）。这一名称是指未达到抑菌浓度标准但可以通过更频繁或更高剂量给药来实现抑菌的MIC值。SDD分类已成功地用于指导抗真菌治疗，是一个新的抗细菌药物敏感试验分类，这意味着细菌的药物敏感性取决于所用的给药方案。修正折点规定头孢吡肟敏感分类，用于定义头孢吡肟修正药敏折点的给药方案为每12小时1 g，而SDD分类是基于该给药方案，通过更高的剂量、更频繁的给药或同时采用两种方案，导致更高的头孢吡肟暴露，直至达到美国FDA批准的最大剂量方案[242]。

遗憾的是，在撰写本文时，自动化诊断性抗菌药物敏感性检测仪器的制造商并没有统一更新和获得美国FDA批准对头孢菌素、氨曲南和碳青霉烯类药敏折点修改。通过验证研究，实验室可以选择手动更新折点，调整制造商对其临床仪器的设置。CLSI文件M52中描述了执行此类研究的指导方针[243]。延迟执行修订的折点已被证明是导致耐药肠杆菌科细菌（包括碳青霉烯类耐药菌）传播的重要原因[244]。

CLSI推荐肠杆菌细菌的常规药敏试验包括氨苄西林、头孢唑林、庆大霉素和妥布霉素。泌尿道分离的大肠埃希菌可检测磷霉素和其他用于非复杂性尿路感染的药物，包括甲氧苄啶-磺胺甲噁唑、呋喃妥因和口服头孢菌素的药敏情况。治疗非复杂性UTI时，CLSI指南推荐使用替代药物头孢唑林来预测口服头孢克洛、头孢地尼、头孢泊肟、头孢丙烯、头孢呋辛、头孢氨苄和氯碳头孢的活性。如果它们被用作口服制剂，实验室可以考虑单独检测头孢地尼、头孢泊肟和（或）头孢呋辛，因为一些菌株对这些药物仍然敏感，而对头孢唑林耐药[245]。少数情况下，肠外途径给药的头孢唑林可用于治疗非复杂UTI；在这些病例中，用于预测治疗非复杂UTI口服药物活性的折点也可应用于头孢唑林（头孢唑林MIC =16 μg/ml判定为敏感）。

对于从CSF中分离的大肠埃希菌和其他肠杆菌科细菌，应对头孢噻肟或头孢曲松进行药敏检测以代替头孢唑林。以下抗菌药物不应常规应用于从CSF中分离的大肠埃希菌或其他肠杆菌科细菌的药敏报告，因为它们是不可选择的药物，且可能对治疗CSF感染无效，这些药物是仅有口服剂型的药物、一代和二代头孢菌素（除肠外给药的头孢呋辛）、头霉素类、克林霉素、大环内酯类、四环素和氟喹诺酮类。

（二）致泻性大肠埃希菌

对STEC腹泻或HUS的抗菌治疗存在争

议：一些报道提出抗生素会增加 HUS 的风险[246]，而一篇已发表的 meta 分析显示，风险并未明显增加[247]。目前缺乏证据支持对 STEC 菌株进行常规的抗菌药物敏感试验。STEC 菌株几乎对人类医学中使用的抗菌药物都敏感。CDC 2015 年的数据表明，181 例 O157 型菌株对氨苄西林的耐药率为 6.6%，对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑的耐药率为 0.6%，对环丙沙星的耐药率为 0%，对四环素的耐药率为 9.9%（http://www.cdc.gov/narms/index.html）。目前，很少有实验室常规分离其他致泻性大肠埃希菌（ETEC、EIEC 或 EAEC）。因此，它们的敏感性分布在很大程度上是未知的。

(三)志贺菌

志贺菌病通常是自限性的，但抗菌药物治疗可缩短病程和细菌播散，从而防止传播。由于志贺菌的耐药性备受关注，因此实验室检出的所有分离株都应进行药敏试验。CLSI 建议常规报告氨苄西林、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑和氟喹诺酮类的药敏结果，并提示志贺菌不应报告一代和二代头孢菌素、头霉素类、氨基糖苷类敏感，因为这些药物在临床上通常是无效的[242]。美国 CDC 报道了 2015 年 569 株宋内志贺菌和福氏志贺菌分离株的耐药率。根据 2015 年 CLSI 折点，其中 42.5%对氨苄西林耐药，38.3%对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑耐药，2.5%对环丙沙星耐药。氨苄西林的耐药性是可变的，并且有一定的种属特异性，福氏志贺菌的耐药率为 60%～90%，宋内志贺菌的耐药率为 10%～73%，鲍氏志贺菌的耐药率为 21%～24%，痢疾志贺菌的耐药率为 30%～40%[88,248]。所有菌种对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑的耐药率通常超过 60%～80%[88,248]。这些高耐药率使得氨苄西林和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑作为经验治疗药物时效果不佳。直到 21 世纪初，对环丙沙星的耐药率仍然很低，而在亚洲部分地区和印度，随着治疗急性胃肠炎时环丙沙星的使用量增加，环丙沙星的耐药率也急剧上升。2000－2004 年进行的一项大型多中心研究发现，中国、巴基斯坦和越南的福氏志贺菌耐药率为 2%～6%[88]。到 2009 年，这些国家环丙沙星的耐药率增加近 30%[94]。在美国，对环丙沙星的耐药率一直很低，总体为 1%～3%[94]；然而，已报道在特定暴发时耐药率超过 80%[96,102]。2017 年，美国 CDC 发布了一份健康咨询报告，提醒如果环丙沙星 MIC 值为 0.12～1.0 μg/ml，不得使用氟喹诺酮类药物治疗志贺菌感染，因为根据当前的 CLSI 折点（https://emergency.cdc.gov/han/han00401.asp），该分离株将被判定为敏感或中介。MIC 值在这一范围内的菌株可能含有质粒介导的喹诺酮类耐药基因，从而增加了治疗失败的风险；2015 年，美国 CDC 检测的人源志贺菌分离株中有 8.8%的 MIC＞0.06 μg/ml（http://www.cdc.gov/narms/index.html）。

由于对传统抗生素的普遍耐药性，大环内酯类药物，特别是阿奇霉素越来越多地用于治疗志贺菌病。然而，目前阿奇霉素尚没有志贺菌临床敏感性折点。2016 年，CLSI 针对福氏志贺菌和宋内志贺菌建立了阿奇霉素流行病学界值（ECV；在 EUCAST 中也写为 ECOFF）。ECV 可以区分无阿奇霉素耐药机制的分离株（野生型）与获得和（或）突变耐药机制的菌株。ECV 将用于监测这些志贺菌中出现的耐药性，但它不能作为一个临床折点，因为志贺菌治疗的结果数据和药代动力学-药效学数据尚未得到充分评估[242]。2015 年，美国 CDC 报道，9.8%的宋内志贺菌和福氏志贺菌的分离株中阿奇霉素的 MIC≥32 μg/ml，此 MIC 是宋内志贺菌的 ECV。根据 CLSI 规定，福氏志贺菌的 ECV 稀释倍数为 1 $\log_2$，≥16 μg/ml。已建立针对福氏志贺菌的纸片扩散法的 ECV，但是根据 CLSI 测定，纸片扩散法检测宋内志贺菌对阿奇霉素的敏感性不可靠且不被允许[242]。EUCAST 建议，阿奇霉素 MIC＜16 μg/L 的志贺菌属分离株允许使用阿奇霉素治疗。发生同性性行为的男性成为患阿奇霉素非野生型志贺菌属的特殊风险对象[249,250]。

尽管美国和欧洲各国很少见，但有报道发现印度和中国已经发现了耐 ESC 的志贺菌菌株。在中国，头孢噻肟耐药率高达 30%[251]。这些菌株含有 $bla_{\text{CTX-M-15}}$ 和 $bla_{\text{CTX-M-14}}$ ESBL 和（或）CMY-2 AmpC 酶。由于这种高度的变异性和新出现的耐药性，建议使用抗生素敏感性试验指导所有志贺菌感染的治疗[252]。

(四)沙门菌

单纯性沙门菌胃肠炎不推荐使用抗菌药物治疗，也不推荐对粪便分离株进行常规药敏试验。

然而，确定抗菌药物耐药模式通常对监测很有价值，可以定期监测沙门菌分离株之间对抗菌药物耐药的发展和传播。与单纯性沙门菌病相比，使用适当的抗菌药物对侵袭性沙门菌和伤寒感染患者至关重要，应尽快报告这些分离菌的抗菌药物敏感性。未经治疗的伤寒的病死率＞10%；当伤寒患者接受适当的抗生素治疗时，其病死率应＜1%。然而，沙门菌对一种或多种抗菌药物耐药，特别是伤寒沙门菌和甲型副伤寒沙门菌的耐药性增加，使得选择合适的抗菌药物成为问题。特别是，伤寒沙门菌对环丙沙星的敏感性降低和治疗失败的数量增加引起人们关注[253]。目前 CLSI 的推荐用于检测从肠道外感染分离出的沙门菌，以及检测伤寒沙门菌和 A、B、C 型副伤寒沙门菌对氨苄西林、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑、环丙沙星和 ESC 的敏感性。此外，可以检测并报告沙门菌肠外分离株对氯霉素和阿奇霉素的敏感性。由于缺乏其他肠道沙门菌血清型的数据，阿奇霉素折点只适用于伤寒沙门菌[242]。不应该报告沙门菌对一代和二代头孢菌素、头霉素类和氨基糖苷类药物敏感性，因为这些药物在临床上无效。

历史上，CLSI 和 EUCAST 认可使用萘啶酸筛选试验来预测沙门菌中 *gyrA* 和 *parC* 的 QRDR 突变，以及氟喹诺酮类药物用于治疗肠外沙门菌感染和伤寒的活性。然而，萘啶酸并没有检测到质粒携带的氟喹诺酮类耐药机制，该机制在肠沙门菌分离株中出现的频率越来越高[253]。因此，CLSI 建立了沙门菌特异的环丙沙星和左氧氟沙星 MIC 折点，这些折点低于其余肠杆菌科的折点[253]。作为替代方法，可以使用由 EUCAST 和 CLSI 推荐的培氟沙星纸片扩散试验来预测氟喹诺酮类药物的敏感性[238,254]。培氟沙星纸片扩散检测法在资源匮乏的国家尤其有用，这些国家无法使用基于 MIC 的检测方法，并且读取环丙沙星纸片扩散检测结果也是一项挑战[253]。然而，培氟沙星在美国是不可用的，也不能检测所有氟喹诺酮类耐药机制，如 *aac*(6′)-*Ib-cr*。CLSI 指南指出，评估沙门菌对氟喹诺酮类药物敏感性或耐药性的首选试验是环丙沙星 MIC 或左氧氟沙星 MIC，具体取决于氟喹诺酮类药物的治疗作用。在美国，还没有商用的自动药敏测试系统能将氟喹诺酮类药物的浓度低到足以涵盖沙门菌的折点。因此，以 CLSI 沙门菌为折点的环丙沙星纸片扩散法可用于预测氟喹诺酮类药物的敏感性[255]。虽然美国 FDA 没有批准沙门菌的折点，但已经证明 Etest 可以很好地用于测定肠沙门菌环丙沙星和左氧氟沙星 MIC 值[255]。

沙门菌的抗菌药物耐药性因血清型而异；将对氨苄西林、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑和氯霉素耐药定义为多重耐药性。在 2014 年，作为国家抗菌药物耐药监测的一部分进行检测的非伤寒沙门菌中，0.7%具有多重耐药性；相比之下，4.3%对环丙沙星不敏感(MIC＞0.06 μg/ml)，2.4%对头孢曲松不敏感，小于 0.1%的菌株阿奇霉素 MIC≥32 μg/ml。在 2014 年检出的伤寒沙门菌分离株中，74.0%对环丙沙星不敏感，0%对头孢曲松和阿奇霉素不敏感(http://www.cdc.gov/narms/)。

十、总结

埃希菌属在人体内数量丰富，定植于胃肠道，但当携带了恰当的毒素和黏附因子时，会导致人类胃肠炎和脑膜炎。诊断的复杂化、生化反应的可变性会误导实验室工作人员，使他们难以从菌株中鉴别埃希菌属与其他疾病相关的菌属(如志贺菌和沙门菌)。使用适当的分离培养基及新型诊断技术将提高我们对这些属的流行病学的理解，并最终达到治愈患者的目的。

参考文献请扫二维码查阅

第40章 克雷伯菌属和部分肠杆菌目菌属

STEPHEN J. FORSYTHE, JOHANN PITOUT, ANGELLA CHARNOT-KATSIKAS, KEVIN ALBY, KAREN M. FRANK

(杨青 译;曾吉、马筱玲 审校)

克雷伯菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、沙雷菌属(*Serratia*)、邻单胞菌属(*Plesiomona*)和克洛诺杆菌属(*Cronobacter*)在临床实验室中很常见,可引起人类多种感染包括菌血症、脑膜炎、伤口感染、呼吸道和泌尿道感染。除人类来源外,本章中的菌属通常也可分离自植物、动物和环境。部分菌属包括在ESKAPE病原体列表中(屎肠球菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和肠杆菌属的首字母缩写),美国感染病学会把这些细菌专门归组,因为这些细菌引起的感染甚至严重的感染很常见,并且具备多种耐药机制可"逃避"抗菌治疗[1]。本章包括了肠杆菌目(Enterobacteriales)的许多菌属,肠杆菌科(Enterobacteriaceae)的部分菌属在本书的不同章节介绍,如第39章埃希菌、志贺菌和沙门菌,第41章耶尔森菌科耶尔森菌。本章包含有关菌属的分类、检测、鉴定,而且还涉及全球抗菌药物耐药性问题。

一、分类

肠杆菌目已重新分类,包括7个科:肠杆菌科、欧文菌科(*Erwiniaceae*)、果胶杆菌科(*Pectobacteriaceae*)、耶尔森菌科(*Yersiniaceae*)、哈夫尼亚菌科(*Hafniaceae*)、摩根菌科(*Morganellaceae*)及布戴维采菌科(*Budviciaceae*)。该目包括250多个菌种,用于肠杆菌目重新分类的综合比较基因组分析包括基于1548个核心蛋白、53个核糖体蛋白和4个多位点序列分析蛋白的系统发育重建,以及目内菌种全基因组的相似性[2]。在20世纪60年代,肠杆菌科仅包括10个属和24个菌种,而在最近重新分类之前,已包括30个属和130多个菌种。肠杆菌科菌种的分类一直是个有争议的问题,因为很难将该科的菌种划分为明显可区分的系统发育组,其分类学经常变化[3]。

具有临床意义的菌种频繁重新分类常导致负责微生物监测和控制的微生物学家和监管机构感到困惑。尽管这种情况并非肠杆菌目所独有,但由于其对临床和公共卫生的重要性而显得尤其明显。许多肠杆菌目菌种有异质性,其中大多数都是根据数十年前的形态学和表型特征进行分类。

除了表型特征,基因组GC含量、DNA-DNA杂交和16S rRNA基因测序已用于细菌的分类[4,5]。由于基因多个拷贝间存在微异质性,16S rRNA基因对肠杆菌目亲缘性非常接近的菌种鉴定往往不可靠,仍需要多种分类方法[6,7]。因此,仅根据16S rRNA基因序列就将未知的分离菌归为某个特定的菌种是不可能的。

一种分类方法是使用单拷贝管家基因区域(等位基因或位点)的组合来产生多位点序列分析(multilocus sequence analysis, MLSA)。这种管家基因必须存在于被研究的分类单元中,必须作为单拷贝基因出现,并且必须彼此独立[9]。目前,已建立了大量的基于7个典型管家基因的国际多位点序列分型(multilocus sequencing typing, MLST)方案,可以通过如 http://www.pubMLST.org 等集中式数据库访问。MLST分型技术的应用,识别了许多明确的具有特殊临床意义的序列型(sequence type, ST),如大肠埃希菌ST131和肺炎克雷伯菌ST258。

MLSA中的基因位点来自多个管家基因,比单个16S rRNA基因序列分析具有更好的系统发

育分辨率。用于肠杆菌目细菌分类的 MLSA 通常只需要 4～5 个基因位点，如 *recN*、*rpoA*、*rpoB*、*thdF*、*infB*、*atpD* 和 *gyrB*[10-13]，偶尔也只用 3 个基因位点，但这是不可取的。与 16S rRNA 基因测序相比，应用管家基因会获得不同的或更精细的系统发育分类。但是，这些结果可能会和 DNA-DNA 杂交或其他基因分析所得的数据不对应[7,14]。

全基因组测序（whole-genome sequencing，WGS）的应用，发展了少数 in silico（用计算机模拟的生物实验）来代替 DNA-DNA 杂交，如平均核苷酸一致性[13]。尽管并不存在一个通用的阈值来界定菌种，但通常用 DNA-DNA 杂交值＜70％和平均核苷酸一致性＜（95％±0.5％）作为界定种的阈值。

自本手册第 11 版发布以来，肠杆菌目发生了一些分类学变化，包括柠檬酸杆菌属（*Citrobacter*）、肠杆菌属（*Enterobacter*）、弗朗科杆菌属（*Franconibacter*）、克雷伯菌属、泛菌属（*Pantoea*）、拉恩菌属（*Rahnella*）、沙雷菌属（*Serratia*）、干燥杆菌属（*Siccibacter*）和塔特姆菌属（*Tatumella*）的菌种。随着其他分析的应用将来肯定会有进一步的分类学变化。表 40-1 和表 40-2 涵盖了本章中讨论的肠杆菌目菌属。表 40-2 包括了一些最新的分类，并且也包括了部分非人类临床标本中分离到的菌属和菌种。这些菌属临床意义可能有限，并且临床微生物学家可能也不熟悉。仅从昆虫、植物、鱼类、海洋动物或鸟类中分离的肠杆菌目细菌不包括在本章的表格或文本中。随着时间的推移分类术语也会变化，可以在 LPSN（已命名的原核生物名称列表）网站 http://www.bacterio.net/上找到更新。

表 40-1　肠杆菌目选定菌属和菌种的分类命名、来源[a]

当前（以前）命名	临床来源	环境数据
柠檬酸杆菌属（*Citrobacter*）		
无丙二酸柠檬酸杆菌（*C. amalonaticus*）	粪便，血液，伤口，UT，RT	动物
布氏柠檬酸杆菌（*C. braakii*）	粪便，UT，伤口	类似于弗劳地柠檬酸杆菌
欧洲柠檬酸杆菌（*C. europaeus*）	粪便	水
法摩柠檬酸杆菌（*C. farmeri*）	粪便，UT，血液，伤口，RT	
弗劳地柠檬酸杆菌（*C. freundii*）	各种部位；粪便最常见	水，土壤，鱼类，动物，食物
吉伦柠檬酸杆菌（*C. gillenii*）	粪便，UT，血液	同弗劳地柠檬酸杆菌
克氏柠檬酸杆菌（*C. koseri*）	各种部位；CSF 最常见	
莫林柠檬酸杆菌（*C. murliniae*）	粪便，血液，UT，伤口	同弗劳地柠檬酸杆菌
巴斯德柠檬酸杆菌（*C. pasteurii*）	粪便	
塞氏柠檬酸杆菌（*C. sedlakii*）	粪便，UT，血液，伤口	同弗劳地柠檬酸杆菌
乌克曼柠檬酸杆菌（*C. werkmanii*）	粪便，血液，伤口	同弗劳地柠檬酸杆菌
杨氏柠檬酸杆菌（*C. youngae*）	粪便，UT，血液，伤口	同弗劳地柠檬酸杆菌
克洛诺杆菌属（*Cronobacter*）		
都柏林克洛诺杆菌（*C. dublinensis*）［阪崎肠杆菌（*E. sakazakii*）］	伤口，眼，血液	配方奶粉工厂，水
丙二酸克洛诺杆菌（*C. malonaticus*）［阪崎肠杆菌（*E. sakazakii*）］	CSF，血液，伤口，RT，耳	无处不在；婴幼儿配方奶粉
莫氏克洛诺杆菌（*C. muytjensii*）［阪崎肠杆菌（*E. sakazakii*）］	骨髓，血液	无处不在；婴幼儿配方奶粉
阪崎克洛诺杆菌（*C. sakazakii*）［阪崎肠杆菌（*E. sakazakii*）］	RT，伤口，CSF，粪便	无处不在；婴幼儿配方奶粉
图列茨克洛诺杆菌（*C. turicensis*）［阪崎肠杆菌（*E. sakazakii*）］	血液	无处不在；婴幼儿配方奶粉
普遍克洛诺杆菌（*C. universalis*）	伤口	无处不在；婴幼儿配方奶粉

（续 表）

当前(以前)命名	临床来源	环境数据
肠杆菌属(*Enterobacter*)		
阿氏肠杆菌(*E. asburiae*)	UT,RT,粪便,伤口,血液	水
E. bugandensis	新生儿血液	
生癌肠杆菌(*E. cancerogenus*)	伤口,RT,粪便	动物,水
阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)	各种部位	水,土壤,污水,肉类
霍氏肠杆菌(*E. hormaechei*)	各种部位	青蛙;植物
神户肠杆菌(*E. kobei*)	血液,RT,UT	食物
路氏肠杆菌(*E. ludwigii*)	UT,RT,血液,粪便	食物
马赛肠杆菌(*E. massiliensis*)	粪便	
欧文菌属(*Erwinia*)		
E. billingiae	皮肤,血液	
桃色欧文菌(*E. persicina*)	尿	
E. tasmaniensis	淋巴结	
哈夫尼亚菌属(*Hafnia*)		
蜂房哈夫尼亚菌(*H. alvei*)	粪便,血液、RT	
副蜂房哈夫尼亚菌(*H. paralvei*)	粪便、尿、液体/引流液	无处不在
克雷伯菌属(*Klebsiella*)		
产气克雷伯菌(*K. aerogenes*)[产气肠杆菌(*E. aerogenes*)]	各种部位	无处不在
肉芽肿克雷伯菌(*K. granulomatis*)	生殖道	无;只见于人类
肺炎克雷伯菌肺炎亚种(*K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*)	各种部位,RT/UT 最常见	无处不在
肺炎克雷伯菌臭鼻亚种(*K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*)	鼻分泌物,RT,UT,血液	无;只见于人类
肺炎克雷伯菌鼻硬结亚种(*K. pneumoniae* subsp *rhinoscleromatis*)	鼻分泌物	无;只见于人类
产酸克雷伯菌(*K. oxytoca*)	各种部位,粪便常见	无处不在
类肺炎克雷伯菌(*K. quasipneumoniae*)	血液	
异栖克雷伯菌(*K. variicola*)	血液,尿,伤口	植物
小坂菌属(*Kosakonia*)		
考文小坂菌(*K. cowanii*)[考文肠杆菌(*Enterobacter cowanii*)]	UT,RT,血液,伤口	植物,土壤,婴幼儿配方奶粉
促根生小坂菌(*K. radicincitans*)	血液	植物
莱略特菌属(*Lelliottia*)		
河生莱略特菌(*L. aminigena*)[河生肠杆菌生物群 1 和 2(*E. amnigenus* biogroups 1 and 2)]	血液	植物,水
摩根菌属(*Morganella*)		
摩根摩根菌(*M. morganii*)	各种部位	Unk;哺乳动物和爬行动物胃肠道
泛菌属(*Pantoea*)		
成团泛菌(*P. agglomerans*)[成团肠杆菌、草生欧文菌、米利特欧文菌(*Enterobacter agglomerans*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*)]	各种部位	植物
菠萝泛菌(*P. ananatis*)		植物

（续 表）

当前(以前)命名	临床来源	环境数据
勃伦那泛菌(*P. brenneri*)	尿道，血液	
显著泛菌(*P. conspicua*)	血液	
分散泛菌(*P. dispersa*)	血液，新生儿败血症	植物，种子
清晰泛菌(*P. eucrina*)	RT，脊髓液，UT	
小肠泛菌(*P. intestinalis*)	粪便	
腐败泛菌(*P. septica*)	血液，粪便，皮肤	
光杆状菌属(*Photorhabdus*)		
非共生光杆状菌(*P. asymbiotica*)	伤口，血液	可能是昆虫
邻单胞菌属(*Plesiomonas*)		
类志贺邻单胞菌(*P. shigelloides*)	粪便，血液	水生环境，动物
多源杆菌属(*Pluralibacter*)		
日勾维多源杆菌(*P. gergoviae*) [日勾维肠杆菌(*E. gergoviae*)]	RT，UT，血液	水，化妆品
变形杆菌属(*Proteus*)		
奇异变形杆菌(*P. mirabilis*)	UT，血液，CSF	动物，鸟类，鱼类，食物
潘氏变形杆菌(*P. penneri*)	UT，血液，伤口，粪便，眼	
普通变形杆菌(*P. vulgaris*)	UT，伤口，粪便，RT	
普鲁威登菌属(*Providencia*)		
产碱普鲁威登菌(*P. alcalifaciens*)	各种部位；UT/粪便常见	哺乳动物，水
海氏普鲁威登菌/拉氏普鲁威登菌(*P. heimbachae*/*P. rustigianii*)	粪便	企鹅
雷氏普鲁威登菌(*P. rettgeri*)	各种部位；UT最常见	同产碱普鲁威登菌；昆虫
斯氏普鲁威登菌(*P. stuartii*)	各种部位；UT最常见	哺乳动物
拉乌尔菌(*Raoultella*)		
解鸟氨酸拉乌尔菌(*R. ornithinolytica*)	伤口，UT，血液	食物
植生拉乌尔菌和土生拉乌尔菌(*R. planticola* and *R. terrigena*)	类似于肺炎克雷伯菌	植物，水
沙雷菌属(*Serratia*)		
无花果沙雷菌(*S. ficaria*)	RT，伤口	榕树，无花果，植物
居泉沙雷菌(*S. fonticola*)	伤口，RT	水，鸟类
液化沙雷菌复合群(*S. liquefaciens* complex)	RT，伤口	无处不在
黏质沙雷菌(*S. marcescens*)	各种部位；RT最常见	无处不在
气味沙雷菌(*S. odorifera*)	RT，伤口，粪便，血液，UT	植物
普利茅斯沙雷菌(*S. plymuthica*)	RT	水，植物，小型哺乳动物
深红沙雷菌(*S. rubidaea*)	RT，伤口，血液，UT，粪便	水，植物
塔特姆菌属(*Tatumella*)		
T. ptyseos	血液，尿，RT	无处不在，婴幼儿配方奶粉
T. saanichensis	痰	植物

注：[a] 表格所列的菌种均基于人来源的报道；CSF. 脑脊液；RT. 呼吸道；UT. 尿道；数据来源参考文献[2][18][21][41][42][53-58][64][70][72][82][84][93-97][127][233-257]

表 40-2 肠杆菌目其他选定的菌属[a]

人类病原菌或条件致病菌	主要是环境分离株[b]	非人类分离株[c]
加文布丘菌(*Buttiauxella gaviniae*)	水生布戴维采菌(*Budvicia aquatica*)	布丘菌属菌种(*Buttiauxella* species)
迟钝爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)	诺亚克布丘菌(*Buttiauxella noackiae*)	欧文菌属菌种(*Erwinia* species) 瑞士弗朗科杆菌(*Franconibacter helveticus*) 粉末弗朗科杆菌(*Franconibacter pulveris*)
美洲欧文菌(*Ewingella americana*)	保科氏爱德华菌(*Edwardsiella hoshinae*)	拉恩菌属(*Rahnella* spp.)
戴维斯西地西菌(*Cedecea davisae*),拉帕西地西菌(*Cedecea lapagei*),奈氏西地西属(*Cedecea neteri*)	泉布拉格菌(*Pragia fontium*)	*Rouxiella chamberiensis*
抗坏血酸克吕沃尔菌(*Kluyvera ascorbata*),栖冷克吕沃尔菌(*K. cryocrescens*),佐治亚克吕沃尔菌(*K. georgiana*),中间克吕沃尔菌(*K. intermedia*)	粪假柠檬酸杆菌(*Pseudocitrobacter faecalis*),人假柠檬酸杆菌(*Pseudocitrobacter anthropi*) 苏黎世干燥杆菌(*Siccibacter turicensis*) 关岛特拉布斯氏菌(*Trabulsiella guamensis*)	雷金斯堡预研菌(*Yokenella regensburgei*)
非脱羧勒克菌(*Leclercia adecarboxylata*)		
格氏勒米诺菌(*Leminorella grimontii*),里氏勒米诺菌(*L. richardii*)		
威斯康星米勒菌(*Moellerella wisconsensis*)		
Nissabacter archeti[d]		
水生拉恩菌(*Rahnella aquatilis*),杂色拉恩菌(*R. variigena*)		

注:[a] 数据来自参考文献[48][49][51][62][64][74][82][196][207][246][258-269]。[b] 罕见的人类分离株无意义、或不确定、有意义。[c] 环境分离株:鱼类,海洋,动物,或鸟类分离株;昆虫分离株或病原菌;植物分离株或植物病原菌。[d] 拟议菌种

二、属的描述

原先属于肠杆菌科的细菌为革兰阴性,兼性厌氧,杆菌或球杆菌,大小(0.3~1.0)μm×(0.6~6.0)μm。不同菌种发酵葡萄糖产生不同的终产物,可通过甲基红和 V-P 试验确定[16]。通常氧化酶阴性,无芽胞,只有少数例外。生长温度18~47℃,pH 4.0~8.0,盐浓度 0~5%。动力不定,取决于有无周鞭毛或极鞭毛。表 40-1 和表 40-2 所列从人类标本分离到的菌种,除少数阿氏克雷伯菌(*Klebsiella asburiae*)菌株有动力外[17],其他所有的克雷伯菌属、勒米诺菌属(*Leminorella*)、米勒菌属(*Moellerella*)和塔特姆菌属(现已分别归属于 4 个科)动力均阴性。部分普利茅斯沙雷菌(*Serratia plymuthica*)菌株在 37℃不生长,但本章讨论的该属其他大多数菌种在 25~37℃生长良好。所有菌属都可以有黏液型或粗糙型菌落,克雷伯菌属、拉乌尔菌属(*Raoultella*)和肠杆菌属菌种有荚膜。

仅少数菌属产生色素,部分黏质沙雷菌(*Serratia marcescens*)和大部分深红沙雷菌(*Serratia rubidaea*)及普利茅斯沙雷菌产红色色素即灵菌红素,整个菌落或菌落中央或边缘呈红色。约 80%的克洛诺杆菌属菌种、成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)、非脱羧勒克菌(*Leclercia adecarboxylata*)和非共生光杆状菌(*Photorhabdus asymbiotica*)产黄色色素,25℃孵育比 37℃色素更明显。将平板置于桌面经阳光短时间照射,产色素较弱的菌株就很容易观察到。*Erwinia persicinus* 动力阳性,可以产生粉红色色素。气味沙雷菌(*Serratia odorifera*)菌如其名,以及西地西菌属某些菌种因产烷基-甲氧基吡嗪,有类似马铃薯样的刺激气味[18]。变形杆菌属(*Proteus*)和普鲁威登菌属(*Providencia*)能使 α-氨基酸氧化脱氨基,产生丙酮酸。L-苯丙氨酸脱氨基后,加入氯化铁呈绿色,而 *dl*-色氨酸脱氨基后无须加入氯化铁,在培养基上即可呈现深棕红色[19]。变形杆菌菌体不分裂可形成长菌体的移行细胞(swarmer cell),这些细胞具有丰富的鞭毛,能在固体培养基表面蔓延生

长[20]。发光光杆状菌(*Photorhabdus luminescens*)和非共生光杆状菌具有发光性,在暗室中 5 min 就能产生可见光。

肠杆菌目细菌一般描述中也有些例外。黏质沙雷菌佐久亚种(*Serratia marcescens* subsp. *sakuensis*)和解脲沙雷菌(*Seratia ureilytica*)可以形成芽胞[20-21],类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides*)氧化酶阳性,分解葡萄糖不产气,对弧菌抑制剂 O/129(2,4-二氨基-6,7-二异丙基蝶啶)敏感。营养缺陷型菌株需要特殊的生长物质,超出正常代谢所需的最低限度,通常很少从临床标本中分离到,但确实有从尿路分离到需要半胱氨酸的肺炎克雷伯菌,在常规培养基中形成细小针尖样菌落。如遇到这样的菌株,需在生化培养基或商品化鉴定系统中补充半胱氨酸才能准确鉴定。肉芽肿克雷伯菌(*Klebsiella granulomatis*)极度苛养,只能通过体外细胞培养技术进行培养,但该技术在常规临床微生物实验室通常是不采用的。

三、流行病学、传播和临床意义

肠杆菌广泛分布于整个环境中(表 40-1 和 40-2)。表 40-1 中的许多属种是全世界公认的病原体[22-24]。它们始终位居于人体相关感染病原菌的前十位[25-26]。美国疾病控制和预防中心国家医疗安全网络 2011—2014 年的数据显示,超过 365 000 例与卫生保健相关的感染病例,导管相关性血流感染中克雷伯菌属占 8%,且 10%的克雷伯菌对碳青霉烯耐药[27]。该网络和国家医院内感染监测系统显示,碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌从 2001 年的 1.2%上升至 2011 年的 4.2%,证明耐药菌株的流行在增加[28]。欧洲的感染数据可以从欧洲疾病预防和控制中心(http://ecdc.europa.eu/en/publications)获得,与上述数据类似,同时伴有欧洲健康与食品安全委员会的一则声明:"随着对最后一道防线抗菌药物耐药性的增加,常规手术、分娩、肺炎甚至皮肤感染都有可能再次成为致命的,我们将面临可怕的未来"。可以从相应的卫生监管机构获得欧洲每个国家的具体感染率,如英格兰公共卫生(https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england)。

关于儿科患者感染数据,有一项超过 8000 例儿童菌血症的研究表明,克雷伯菌属、肠杆菌属和沙雷菌属是最常见的分离菌,有一定的耐药性但未达到成人的水平[29]。

(一)克雷伯菌属和拉乌尔菌属

克雷伯菌属属于肠杆菌科,定植在鼻咽部和肠道,粪便被认为是患者感染的重要来源[30]。在一年最热的月份中,肺炎克雷伯菌血流感染率高出 1.5 倍[31]。这比例可能也反映出在炎热的季节里,人体粪便携带率的增加,也说明环境中肺炎克雷伯菌的增加。这具有重要意义,因为定植患者比非携带者感染风险增加了 4 倍。肠杆菌属或沙雷菌属没有发现相似的分离率增加。

肺炎克雷伯菌已成为社区和医院内感染的重要病原菌体。这主要是由于出现了 2 种类型的肺炎克雷伯菌:碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌(carbapenem resistant *K. pneumoniae*, CRKP)和高毒力肺炎克雷伯菌(hypervirulent *K. pneumoniae*, HvKP),以及同时具备高耐药性和高毒力的肺炎克雷伯菌。ST258 是 CRKP 最初也是暴发感染最常见的 ST 型,但随着时间的流逝,bla_{KPC} 的传播已导致 CRKP 多样化,以至于某些地区发现多克隆的比率接近 60%[32]。重要的是,已有证据表明肺炎克雷伯菌经常发生菌株间重组,导致产生全新的 CRKP 菌株[33]。HvKP 被广泛定义为肺炎克雷伯菌获得了能够增强荚膜产生和铁载体如沙门菌螯铁蛋白(salmochelin)和气杆菌素(aerobactin)表达的质粒。通常,这些菌株为 K1 或 K2 荚膜血清型,遍布中国台湾和东南亚。HvKP 菌株更容易引起侵袭性感染,并经常表现为肝脓肿。尽管不常见,但 HvKP 菌株能够通过获得质粒或其他元件导致多重耐药[34]。高黏表型往往提示实验室工作人员需考虑高毒力菌株,可通过拉丝试验阳性粗略显示。对 HvKP 的流行病学和临床感染谱还需进一步了解。

临床实验室分离到的肺炎克雷伯菌大部分是肺炎克雷伯菌肺炎亚种(*K. pneumonia* subsp. *pneumoniae*),肺炎克雷伯菌另外 2 个亚种是肺炎克雷伯菌硬鼻亚种(*K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*)和肺炎克雷伯菌臭鼻亚种(*K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*)。它们以前是不同的菌种:硬鼻克雷伯菌和臭鼻克雷伯菌,但后来被重新归为肺炎克雷伯菌亚种。这些菌种分别与特

定的慢性感染性疾病有关，即鼻硬结病和萎缩性鼻炎（臭鼻症）[35]。尽管它们在生化上是可区分的，但基质辅助激光解析电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）可能无法区分肺炎克雷伯菌的各个亚种。该属菌种的系统发育仍在继续演化，最近几个种被重新分类为异栖克雷伯菌（*K. variicola*，KpⅢ）和类肺炎克雷伯菌（*Klebsiella quasipneumoniae*，KpⅡ），后者有2个亚种：类肺炎克雷伯菌类肺炎亚种（*K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*）和类肺炎克雷伯菌拟肺炎亚种（*K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*）[36]。肉芽肿克雷伯菌是杜诺凡病（donovanosis）或者腹股沟肉芽肿的病原菌，这种疾病是以慢性生殖器溃疡为特征[35,37]。它主要存在于热带国家，通过性传播，人类是已知的唯一宿主。越来越多的研究认为，携带染色体编码热不稳定细胞毒素的产酸克雷伯菌可引起抗菌药物相关出血性结肠炎[38-39]。抗菌药物相关出血性结肠炎是一种自限性疾病，与使用β-内酰胺类抗菌药物有关，停止使用相关抗菌药物后症状自动消退。它不同于艰难拟梭菌（*Clostridioides difficile*）引起的假膜性结肠炎，此病无假膜形成，大便通常是血性的。目前报道的异栖克雷伯菌大多数分离自无菌部位，主要是血液和尿[40-41]。来自巴西的一项研究用*rpoB*基因测序来鉴定该菌（5株中有3株来自尿道），进一步证明它是人类致病菌[40]。

肠杆菌科中的解鸟氨酸拉乌尔菌（*Raoultella ornithinolytica*）、植生拉乌尔菌（*Raoultella planticola*）和土生拉乌尔菌（*Raoultella terrigena*）是另一类与肺炎克雷伯菌相似的菌种，已被重新分类。尽管拉乌尔菌具有许多相似的生化特点，但10℃生长并能利用L-山梨糖可资鉴别[42]。此外，MALDI-TOF MS也可鉴别[43]。在欧洲的研究中，3.5%～19%最初鉴定为克雷伯菌的临床分离株最终确认为植生拉乌尔菌，但在美国（436株）和巴西（122株）的研究中，均只有一株鉴定为植生拉乌尔菌，表明这些菌种的流行具有地域性[40,44-45]。植生拉乌尔菌很少有引起人类感染的报道，土生拉乌尔菌存在于水源和土壤中，也很少感染人类，2007年首次报道了该菌引起人类感染的病例——一例45岁患者肝移植后发生土生拉乌尔菌引起的心内膜炎[46]。

（二）欧文菌属（*Erwinia*）、肠杆菌属和泛菌属

从20世纪70年代初以来，曾被分类为草生欧文菌-聚团肠杆菌（*Erwinia herbicola-Enterobacter agglomerans*）复合群的细菌不断地被重新评估和分类修订。欧文菌属（*Erwinia*）曾经是由肠杆菌科中与植物相关的菌种组成，现已成为一个新的科——欧文菌科。实际上，解淀粉欧文菌（*Erwinia amylovora*）被列为最重要的植物病原体，引起火疫病，威胁苹果和梨的商业生产[47]。由于表型或基因型的相似性，许多欧文菌已被重新归到泛菌属或肠杆菌属。被重新归为肠杆菌属的菌种包括原先命名为致癌欧文菌（*Erwinia cancerogenus*）、超压欧文菌（*Erwinia nimipressuralis*）和溶解欧文菌（*Erwinia dissolvens*）[48]。尽管欧文菌临床分离株非常罕见，但也可以引起人类机会性感染[49-51]。然而，在一些市售的鉴定系统中并不包括欧文菌属，这些菌株可能都被归到泛菌属或肠杆菌属，如果实验室使用质谱和基因分析等技术，就可以经常鉴别出欧文菌。

肠杆菌属属于肠杆菌科，存在于自然环境如水、污水、蔬菜和土壤中。曾经被归为肠杆菌属的一些菌种已被重新划分为多个新的属，属于不同的科：泛菌属、莱略特菌属（*Lelliottia*）、小坂菌属（*Kosakonia*）、多源杆菌属（*Pluralibacter*）、弗朗科杆菌属、克吕沃尔菌属（*Kluyvera*）、克洛诺杆菌属和干燥杆菌属。阴沟肠杆菌（*E. cloacae*）和产气肠杆菌（*E. aerogenes*）（2017年重新分类为产气克雷伯菌）在临床样本中很常见，也存在于乳制品、肉类、医院环境、皮肤及人和动物的肠道中[52-53]。霍氏肠杆菌（*E. hormaechei*）和路德维希肠杆菌（*E. ludwigii*）可以分离自人类各种标本，包括血液[17,54,55]。非人类标本分离的路德维希肠杆菌尚未报道，霍氏肠杆菌可以分离自植物。在坦桑尼亚的某个新生儿病房暴发败血症，从血液中分离到了*E. bugandensis*[56]。马赛肠杆菌（*E. massiliensis*）分离自粪便标本，但其临床意义尚不清楚[57]。

由于固有耐药及质粒介导的耐药不断增加，肠杆菌属引起了越来越多的关注。医院内肠杆菌的定植和感染通常与受污染的医疗设备和仪器有关。同时肠杆菌属细菌也经常随食物摄入，因此

内源性来源也需关注[58,59]。肠杆菌属包括阴沟肠杆菌和成团泛菌（*P. agglomerans*）（聚团肠杆菌）的分类已经被修订了数次，并且这些菌代表了多系复合群[48]。对这些复合群菌种的描述和认知仍存在不确定性，直接影响我们对肠杆菌属细菌生态学和流行病学认识的可信度。而且，分类法的更新尤显重要，一例败血症原先认为是阴沟肠杆菌引起（VITEK 2 鉴定），后来使用基因方法将该病原菌鉴定为促根生小坂菌（*Kosakonia radicincitans*）[60]。这一发现的意义在于，与阴沟肠杆菌不同，小坂菌染色体上不携带 AmpC β-内酰胺酶基因，从而允许选择更多更合适的抗菌药物进行目标性治疗。除肠杆菌属外，其他“SPICE/MYSPACE”菌种（代表携带染色体 AmpC 酶的菌种缩写）包括沙雷菌属、假单胞菌属、吲哚阳性的泛菌属、柠檬酸杆菌属、摩根菌属、耶尔森菌属、普鲁威登菌属和气单胞菌属。

属于欧文菌科的泛菌属，通常分离自植物、人类和自然环境。它们的黄色色素是一种毒力因子，具有抗氧化能力并能抵御紫外线。泛菌属最初分为 2 个群，归属于草生欧文菌-聚团肠杆菌复合群，以及被 Brenner 等分为 DNA Ⅰ、Ⅱ、Ⅳ、Ⅴ群[61]。本手册的前几个版本中，该属经历了多次分类学修订。目前，泛菌属包括约 24 种有效发表的菌种，包括成团泛菌（*P. agglomerans*）、菠萝泛菌（*P. ananatis*）、分散泛菌（*P. dispersa*）及斯氏泛菌（*P. stewartii*）[62-63]。最近，MLSA（4 个等位基因方案）的应用支持其他泛菌的分类，包括勃伦那泛菌（*P. brenneri*）、显著泛菌（*P. conspicua*）、清晰泛菌（*P. eucrina*）、小肠泛菌（*P. intestinalis*）和腐败泛菌（*P. septica*）等[57]）。此外，杓兰果胶杆菌（*Pectobacterium cypripedii*）则归到泛菌属，命名为杓兰泛菌（*Pantoea cypripedii*）[57]，而柠檬泛菌（*Pantoea citre*）、斑点泛菌（*Pantoea punctata*）和土壤泛菌（*Pantoea terrea*）已被归类到塔特姆菌属[64]。由于在表型上与其他肠杆菌的相关菌种类似，对泛菌属菌种快速鉴定一直存在问题[65]。但塔特姆菌属产生 2-酮葡糖酸脱氢酶，可与泛菌属鉴别[64]。尽管 MALDI-TOF MS 的应用已能够区分许多泛菌属菌种，但临床还是依赖商品化的生化测试剂盒，许多分离株可能被错误地鉴定为成团泛菌[66]。

泛菌属大多数菌种与植物相关或为植物病原体。泛菌属也会引起人类感染[63,67]。虽然也有其他菌种感染的报道，如勃伦那泛菌、显著泛菌、清晰泛菌和腐败泛菌，但成团泛菌是人类标本中最常见的泛菌属菌种[57]。零星感染与被土壤或植被污染的物体穿透性创伤相关，可导致软组织感染、化脓性关节炎或骨髓炎，而与卫生保健相关的感染和暴发通常涉及受污染的静脉注射液、肠外营养或其他输注液体。成团泛菌感染的儿童往往有严重的基础疾病，呈多种微生物混合感染，故即使标本来自无菌部位其临床意义也不明确[63]。有报道 1 例菠萝泛菌引起的角膜溃疡，与蔬菜有关[68]。从人粪便中分离出小肠泛菌，但其意义尚不清楚[57,69]。分散泛菌可引起导管相关性血流感染[70]。

（三）克洛诺杆菌

克洛诺杆菌属（以前称为阪崎肠杆菌）属于肠杆菌科，目前包含 7 个种：香料克洛诺杆菌（*C. condimenti*）、都柏林克洛诺杆菌（*C. dublinensis*）、丙二酸克洛诺杆菌（*C. malonaticus*）、莫氏克洛诺杆菌（*C. muytjensii*）、阪崎克洛诺杆菌（*C. sakazakii*）、图列茨克洛诺杆菌（*C. turicensis*）和普遍克洛诺杆菌（*C. universalis*）[48,71-73]。克洛诺杆菌属原先包括瑞士克洛诺杆菌（*C. helveticus*）、粉末克洛诺杆菌（*C. pulveris*）和苏黎世克洛诺杆菌（*C. zurichensis*），以前被称为瑞士肠杆菌、粉末肠杆菌和苏黎世肠杆菌。这些菌种已重新分类为瑞士弗朗科杆菌（*Franconibacter helveticus*）、粉末弗朗科杆菌（*Franconibacter pulveris*）和苏黎世干燥杆菌（*Siccibacter turicensis*）[74]。克洛诺杆菌属中，阪崎克洛诺杆菌和丙二酸克洛诺杆菌是临床样本中最常见的分离菌[75-76]，其中阪崎克洛诺杆菌主要见于新生儿感染，而丙二酸克洛诺杆菌则多见于成人感染。其他菌种最初分离自环境，但也有一些临床病例报道[77]。尽管不常见，阪崎克洛诺杆菌与新生儿脑膜炎和坏死性小肠结肠炎的严重病例有关，患儿的病死率较高。除了某些苏黎世克洛诺杆菌，阪崎克洛诺杆菌是克洛诺杆菌属中唯一能利用唾液酸（2-酮-3-脱氧-5-乙酰胺基-d-甘油-d-半乳糖-尤罗索尼克酸）的菌种。这也可能是阪崎克洛诺杆菌更容易引起婴幼儿感染的原因，因为在母乳、婴儿配方奶粉、黏蛋白和神经节苷脂均存在唾液酸[78]。迄今为止，有限的研

究表明，丙二酸克洛诺杆菌可定植在咽喉部，主要引起成人感染[79]。一些临床实验室可能缺乏鉴别性生化反应，无法将克洛诺杆菌鉴定到种的水平。最可靠且稳定的方法是扩增 *fusA* 和 *rpoB* 基因进行 DNA 测序，可通过公开的 MLST 数据库获得(http://pubMLST.org/cronobacter)。克洛诺杆菌属的认识和扩展在文献中引起了很多混乱。2 个常见的错误是：①2007 年前的所有阪崎肠杆菌都被认为是阪崎克洛诺杆菌；②仍有商品化生化反应试剂盒及其数据库在使用阪崎肠杆菌的名称，且不能鉴定所有的克洛诺杆菌属菌种。随着实验室数据库的发展，已可区分弗朗科杆菌属、干燥杆菌属和克洛诺杆菌属，并可将弗朗科杆菌和干燥杆菌鉴定到种的水平[80]。但此类数据库尚未被广泛应用，实验室应注意，使用当前的鉴定系统可能会导致这些菌种鉴定错误。

(四)莱略特菌属、多源杆菌属和小坂菌属

莱略特菌属是肠杆菌科中新成立的菌属，超压肠杆菌(*Enterobacter nimipressuralis*)和河生肠杆菌(*Enterobacter amnigenus*)已重新分类命名为超压莱略特菌(*Lelliottia nimipressuralis*)和河生莱略特菌(*Lelliottia amnigena*)[48,79]。日勾维肠杆菌(*Enterobacter gergoviae*)和梨肠杆菌(*Enterobacter pyrinus*)已划分至新属多源杆菌属，也属于肠杆菌科，分别命名为日勾维多源杆菌(*Pluralibacter gergoviae*)和梨多源杆菌(*Pluralibacter pyrinus*)。河生莱略特菌和日勾维多源杆菌的致病性已确认，而且已报道了一株分离自血液的河生莱略特菌，在同一个质粒上同时携带有 bla_{KPC} 和 *rmtB* 基因[81-83]。小坂菌属也是肠杆菌科新的属，包括原先的考文肠杆菌(*Enterobacter cowanii*)、促根生肠杆菌(*Enterobacter radicincitans*)、栖稻肠杆菌(*Enterobacter oryzae*)和花生肠杆菌(*Enterobacter arachidis*)，分别重新命名为考文小坂菌(*Kosakonia cowanii*)、促根生小坂菌(*Kosakonia radicincitans*)、栖稻小坂菌(*Kosakonia oryzae*)和花生小坂菌(*Kosakonia arachidia*)[48,79,84]。除了考文小坂菌分离自临床标本，其他小坂菌都与植物有关。

(五)沙雷菌属

沙雷菌属属于耶尔森菌科，也是重要的医疗相关病原菌和定植菌。虽然人与人之间接触是主要的传播途径，但医疗器械、静脉输液和其他液体也经常与传播和感染有关[58]。留置导管是通过医务人员传播的主要源头，特别是对于尿路感染。在儿童中，胃肠道是常见的感染来源。通过手接触传播引起的暴发感染往往比较隐匿，需要很长一段时间才能发现。在识别、控制和努力遏制感染暴发前，可能已有多次的反复消长。沙雷菌属的某些菌种和生物型可产生一种非扩散性的红色色素，即灵菌红素或 2-甲基-3-戊基-6-甲氧基丙二烯。该种色素对原生动物可能具有一定毒性，使其在水或者土壤中具有一定的生态优势[85]。黏质沙雷菌产生色素似乎是该菌株起源于环境且低毒力的标志[86]。黏质沙雷菌除了通过角膜接触镜引起急性红眼病外，社区获得性感染是非常少见的[87]。沙雷菌的其他大部分菌种也都可以分离自人类标本，通常是暂时的或引起机会性感染。水源很可能是普利茅斯沙雷菌的主要栖息地。

沙雷菌通常不感染健康人群，但常定植或感染住院患者。黏质沙雷菌是目前唯一报道的引起院内感染的沙雷菌属菌种。尽管液化沙雷菌(*S. liquefaciens*)和深红沙雷菌(*S. rubidaea*)也偶尔能从临床标本中分离到，但它们的致病性还没有确定。沙雷菌引起的感染非常广泛，和其他条件致病菌感染相似，通常引起呼吸道和尿路感染、手术伤口感染和静脉导管相关血流感染，而脑膜炎、脑脓肿、腹腔内感染则比较少见。

(六)柠檬酸杆菌

柠檬酸杆菌属属于肠杆菌科，可引起各种严重感染。柠檬酸杆菌感染包括尿路感染、浅表伤口感染、呼吸道感染、腹腔内感染、菌血症、心内膜炎、婴儿脑膜炎、脑脓肿和败血症。该属菌种分布广泛，可以分离自土壤、水和食物及人类和动物的肠道。柠檬酸杆菌是肠道的主要定植菌，在环境中分离到意味着受到人和动物粪便的污染；部分柠檬酸杆菌新菌种的自然栖息地还有待确定。

柠檬酸杆菌属包括 13 个菌种，其中有 3 个菌种医院内感染最常见：弗劳地柠檬酸杆菌(*Citrobacter freudii*)、克氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter koseri*)和布氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter braakii*)。柠檬酸杆菌是医院内感染的重要条件致病菌，尤其是新生儿和

免疫力低下患者。严重的柠檬酸杆菌感染可以是医疗相关感染或社区获得性感染。多见于老年男性患者(≥65岁),尿路是最常见的感染部位[88-89]。1/3～1/2柠檬酸杆菌感染包括败血症都是多种微生物的混合感染,有较高的病死率(18%～50%)或更长的住院时间[88-89]。脑膜炎绝大多数都是由克氏柠檬酸杆菌引起,包括<2个月的新生儿,其中平均年龄7天的新生儿发病率最高[58,90]。感染的婴儿中有75%发生脑脓肿,幸存患儿常见的后遗症是神经功能损伤。细菌定植是最主要的危险因素。据报道,感染暴发时细菌的定植率可达27%,而正常情况下不足1%[91-92]。最可能的感染途径是通过医护人员之间的接触传播,其次是母婴之间传播。从医院无生命物体或环境中取样很难分离到柠檬酸杆菌。其他柠檬酸杆菌,包括吉伦柠檬酸杆菌(*Citrobacter gillenii*)和莫林柠檬酸杆菌(*Citrobacter murliniae*)可分离自患者、动物、食物和环境标本[93,94]。已从腹泻患者中分离出欧洲柠檬酸杆菌(*C. europaeus*)和巴斯德柠檬酸杆菌(*C. pasteurii*)[95,96]。许多柠檬酸杆菌在人类感染中的作用并不明确,因为文献报道有限,尚不足以确定其临床意义或潜在感染能力。啮齿类柠檬酸杆菌(*Citrobacter rodentium*)能导致鼠类结肠增生,这在成年小鼠中是自限性疾病,但能显著增加幼鼠的发病率和病死率[97]。该菌感染的小鼠,常作为人类肠致病性大肠埃希菌和肠出血性大肠埃希菌的感染模型。

(七)假柠檬酸杆菌属(*Pseudocitrobacter*)

假柠檬酸杆菌属是肠杆菌科新的菌属,其定义是基于巴基斯坦部队医院住院和门诊患者粪便标本中分离到的4株细菌[98]。这些菌株根据生物学表型最初被鉴定为柠檬酸杆菌属,但是16S rRNA基因序列比较显示,这些菌株形成了一个独立的簇,与柠檬酸杆菌属、克吕沃尔菌属、泛菌属、肠杆菌属和拉乌尔菌属的同源性只有97%～98.3%。MLSA(*recN*、*rpoA*、*thdF*和*rpoB*)及对它们各自氨基酸序列的分析也表明,与其余的肠杆菌目细菌相比,这些菌株处于独特的簇中。DNA-DNA杂交技术也支持这些菌株属于新的菌属,目前包括粪假柠檬酸杆菌(*Pseudocitrobacter faecalis*)和人假柠檬酸杆菌(*Pseudocitrobacter anthropi*)2个种,两者之间可用棉子糖和甘露醇发酵试验区别。尽管迄今为止假柠檬酸杆菌的临床意义尚未完全确定,但发现有几株粪假柠檬酸杆菌产NDM-1型碳青霉烯酶。

(八)变形杆菌属、普鲁威登菌属和摩根菌属

变形杆菌属属于摩根菌科,包括6个种:奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、普通变形杆菌(*P. vulgaris*)、潘氏变形杆菌(*P. penneri*)、豪氏变形杆菌(*P. hauseri*)、土地变形杆菌(*P. terrae*)和食物变形杆菌(*P. cibarius*)[99,100]。奇异变形杆菌是该属中临床实验室最常见的菌种,是尿路感染的主要病原菌[100]。普鲁威登菌和摩根菌也属于摩根菌科,与变形杆菌关系密切,其许多菌种[如雷氏普鲁威登菌(*Providencia rettgeri*)、产碱普鲁威登菌(*P. alcalifaciens*)和摩根摩根菌(*Morganella morganii*)]原先都属于变形杆菌。这些菌种广泛分布于环境,是人类和动物消化道的正常定植菌。一项为期6年以人口为基础的变形杆菌大调查中显示,85%(4290/5047)的变形杆菌是社区获得性的,而普鲁威登菌则主要来源于疗养院[102]。女性(69%)和老年人(平均年龄70岁)感染风险最高,常见的标本来源分别是尿(86%)、软组织(7%)、血液(3%)、各种体液(2%)和呼吸道(2%)。奇异变形杆菌最常见(77%),主要来源于尿,其他非奇异变形杆菌(主要是普通变形杆菌)分离自伤口和软组织比尿更常见。普鲁威登菌中,斯氏普鲁威登菌(*P. stuartii*)分离率是其他菌种的2倍。大部分摩根摩根菌被认为是医疗保健相关病原菌,主要是引起尿路感染,也常见于伤口和血流感染,呼吸道感染少见[103]。

(九)哈夫尼亚菌属

哈夫尼亚菌属属于哈夫尼亚菌科,包括2个种:蜂房哈夫尼亚菌(*Hafnia alvei*)和副蜂房哈夫尼亚菌(*H. paralvei*),生化反应(β-葡糖苷酶、丙二酸、D-阿拉伯糖、水杨素和七叶苷)可区分,并且都已从不同意义的临床标本中分离到[104]。尽管蜂房哈夫尼亚菌比副蜂房哈夫尼亚菌毒力更强,但这2种菌均能产生Vero溶细胞毒素(Verocytolytic toxin)。其他报道的毒力特征包括铁载体、抵抗补体介导的裂解作用和拥有1型和3型菌毛[105]。像大多数肠杆菌目菌种,哈夫尼亚菌可分离自各种动物,主要是胃肠道,还可分离自各种

食物包括肉类、乳制品和蜂蜜[106]。

系列病例报道哈夫尼亚菌感染可以是社区获得或医院获得，严重的感染比较少见[107]，主要分离自尿、呼吸道和胃肠道[108]。常见于免疫抑制或有明显合并症的患者，如慢性阻塞性肺疾病、恶性肿瘤或腹部手术。有趣的是，尽管哈夫尼亚菌常与多种微生物混合感染，但许多重要的感染是仅由哈夫尼亚菌所致，这在其他少见肠杆菌感染中罕见。[107]。涉及哈夫尼亚菌的监测研究少见，但已有提示女性和老年人感染风险增加[109]。

(十)类志贺邻单胞菌

类志贺邻单胞菌与肠杆菌目其他成员亲缘关系有限，因科分类位置未被认定而未归属到哪个科，意味着与肠杆菌目的关系未明确[2]。类志贺邻单胞菌以前是邻单胞菌属的唯一菌种，也是肠杆菌科中唯一氧化酶阳性的菌种[110]。邻单胞菌这个名字最初表示与气单胞菌关系密切，但气单胞菌已单独成科并属于不同的目。多种方法包括5S rRNA基因、16S rRNA基因、MLST测序及脂多糖组成和脂质A结构分析，都曾用于邻单胞菌和肠杆菌科其他成员的分组研究[111]。邻单胞菌的自然栖息环境是淡水或低盐水，可以分离自各种脊椎动物，尽管难以区分定植还是感染[111]。发生类志贺邻单胞菌胃肠炎的主要危险因素之一是食用未煮熟的贝类，相比对虾，与牡蛎的关系更强。第2个风险因素是国外旅行，尤其是去日本和中国，去墨西哥或加勒比海旅行也是危险因素。最后一个原因是免疫系统受损，尤其是艾滋病患者，其发病率是其他人群的3倍[111]。对类志贺邻单胞菌的致病性知之甚少，有报道显示其体外可分泌数种毒素：霍乱样毒素、热稳定和不耐热毒素、β-溶血素和细胞毒素复合物[112,113]。菌体抗原也可能在致病性中起作用，因为最常见O17型的编码基因与宋内志贺菌的1型(光滑型)抗原的编码基因几乎完全相同[114]。

尽管相对罕见，但也可发生肠道外感染，包括菌血症、脑膜炎和伤口感染。许多菌血症患者有某种类型的胃肠道损伤或功能障碍，可能导致易感。伤口感染往往与涉水活动中受伤有关[111]。新生儿感染被认为与分娩时垂直传播有关，因为已有数例报道新生儿感染时母亲存在腹泻[115]。

(十一)爱德华菌属

爱德华菌属属于哈夫尼亚菌科，包括迟钝爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)、鲶鱼爱德华菌(*E. ictaluri*)、杀鱼爱德华菌(*E. piscicida*)和保科爱德华菌(*E. hoshinae*)，主要是鱼类病原体，对全球的水产养殖业造成经济损失，迟钝爱德华菌在亚洲鳗鱼群中造成60%以上的病死率[116]。迟钝爱德华菌感染宿主广泛，包括各种鱼类、动物及人类。鲶鱼爱德华菌适合寄生于斑点叉尾鮰，不引起临床问题。保科爱德华菌致病性目前并不明确，对它的栖息地也所知甚少[117]。对77例迟钝爱德华菌的菌血症进行系统回顾性分析，发现其与高病死率(44.6%)明显相关[118]。常见的感染环境危险因素包括食源性疾病、夏季和秋季、东亚和墨西哥海湾地区及暴露于微咸水或未煮熟的鱼。另一个重要发现是，大多数患者(66.2%)有肝胆方面的基础疾病。除菌血症外，迟钝爱德华菌可引起伤口和胃肠道感染，类似于气单胞菌属或创伤弧菌[118]。一些初步的基因组研究表明，迟钝爱德华菌可分为两种基因型，EdwGⅡ型菌株与人类感染有关[119]。

(十二)其他肠杆菌目细菌

随着MALDI-TOF MS作为一种主要的鉴定手段在临床的广泛应用，一些少见或罕见菌引起的感染也随之急剧增加。这些菌种主要是免疫低下患者的条件致病菌，或在临床标本中以短暂或共存的形式存在[58]。对于某些菌种，如西地西菌属(*Cedecea*)、勒米诺菌属、米勒菌属和塔特姆菌属，它们的栖息地依然不清楚，因为很少从非人类标本中分离到，而欧文菌属、勒克菌属(*Leclercia*)和克吕沃尔菌属像其他肠道细菌一样，在自然界广泛存在，在各种食物、水或动物(蜗牛和蛞蝓)中均有发现[58,120-126]。其他分离自人标本的菌属都有具体的自然栖息地，如拉恩菌属(*Rahnella*)(水)或预研菌属(*Yokenella*)和非共生光杆状菌(昆虫和被昆虫咬伤的感染灶)[58,127-129]。非脱羧勒克菌(*L. adecarboxylata*)和克吕沃尔菌属是相对比较常见的分离菌，克吕沃尔菌感染可以发生在任何年龄段的免疫功能正常或不全患者中[130,131]，标本来源广泛，包括血液、组织、尿、脑脊

液和腹水，其中尿路和血液的感染大概各占感染的1/3。将克吕沃尔菌进一步鉴定到种，抗坏血酸克吕沃尔菌（*Kluyvera ascorbata*）引起的感染大约是栖冷克吕沃尔菌（*Kluyvera cryocrescens*）的2倍。关于各种外科和非外科标本的最新报道表明，非脱羧勒克菌的分离和鉴定更多的是来自临床感染[132,133]。威斯康星米勒菌（*Moellerella wisconsensis*）少有报道，首次分离自腹泻患者的大便标本，随后又系列报道了5例感染此菌的腹泻患者，其腹泻类型有自限性的急性无黏液水样腹泻，以及持续数周的慢性腹泻。在大便标本中没有检测出其他腹泻常见的细菌性病原菌或寄生虫，经临床治疗后都转阴性[134]。

四、标本的采集、运输与储存

本章所涵盖的菌种通常由临床标本分离所得，本手册第19章所述的样本采集、处理、分离原则也同样适用。大部分菌种在－70℃可保存1年，第11章中推荐的长期保存方法也非常有效。邻单胞菌属在室温下保存不超过1～2个月，故须－70℃保存。克洛诺杆菌属在5℃不能存活，塔特姆菌属即使在－70 ℃保存也难以超过1年。

五、分离步骤

本章涵盖的临床相关菌株一般从无菌部位分离都不存在困难。但从非无菌部位或环境中分离可能需要专门的培养基，如显色培养基，此种培养基在检测本章中介绍的尿路感染病原体方面具有相似的性能，可替代麦康凯和血琼脂平板[135,136]。选择性培养基可防止变形杆菌迁徙生长并限制黏液样菌落的扩散，从而减少病原菌菌落过度生长。另外，一些选择性培养基上的菌落可直接用于药敏试验，而无须传代培养。

本章涉及的2种腹泻病原菌都很容易分离。迟钝爱德华菌不分解乳糖，H_2S阳性，在肠道选择性培养基上菌落与沙门菌不易区分（不透明或不透明中心黑色），根据吲哚阳性和沙门菌抗血清不凝集可区分两者。使用MALDI-TOF MS可以容易区分这些菌种。邻单胞菌属在肠道选择性培养基上不发酵乳糖和蔗糖，在硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖（TCBS）培养基上不生长，但在头孢磺啶-氯苯酚-新生霉素（CIN）培养基上如出现不透明无粉红色中心菌落（不发酵甘露醇），应考虑邻单胞菌属。另外2个氧化酶阳性的假单胞菌属和气单胞菌属也可在CIN平板上生长，但气单胞菌菌落中心粉红色，边缘不透明，邻单胞菌发酵肌醇，赖氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶、鸟氨酸脱羧酶阳性，可与其他细菌鉴别。

其他条件致病性肠杆菌目细菌可以分离自各种标本，通常在实验室常用培养基上生长良好。部分菌属发酵乳糖或蔗糖，在肠道选择性培养基上呈正常菌落，而另一些菌属可产H_2S，菌落与沙门菌类似。拉恩菌属、爱文菌属和塔特姆菌属可能需要孵育48 h才能生长，塔特姆菌属在MH琼脂上生长不良，药敏试验可能需要肉汤稀释法。肉芽肿克雷伯菌在实验室常规培养基上不生长，可在Hep-2单层细胞培养基上生长[137]。检测肉芽肿克雷伯菌最常用的方法是吉姆萨或瑞氏染色在组织涂片中找到杜诺凡小体（Donovan body），但是这种多形性、两极浓染犹如一个闭合安全别针样的小体，不一定总是存在，依此诊断不可靠。

六、鉴定

鉴别本章中细菌最有用的生化反应见表40-3至表40-13，许多实验室现都采用MALDI-TOF MS鉴定，很少用生化反应进行常规鉴定[138,139]。当质谱鉴定结果模棱两可时，一些实验室也会使用16S rRNA基因测序[140,141]。但还有很多实验室使用自动化或手工系统中的生化试验来鉴定。质谱鉴定取决于可用的数据库，故经常对制造商提供的数据库和自建库进行改进和扩展。美国FDA批准的数据库如布鲁克（Bruker）和生物梅里埃（bioMérieux）包括了表40-1所列出的最常见的菌属，但菌种可能归为一个群，且并未包括表40-1中所有的菌属。供科研使用的数据库更广泛，但需要更多的实验室自建验证。

表 40-3 柠檬酸杆菌属各菌种生化特征[a]

菌名	吲哚	鸟氨酸脱羧酶	丙二酸盐	产酸[b]			
				蔗糖	卫矛醇	蜜二糖	侧金盏花醇
无丙二酸柠檬酸杆菌	+	+	−	−	−	−	−
布氏柠檬酸杆菌	V	+	−	−	V	V	−
欧洲柠檬酸杆菌	−	−	−	V	V	−	−
法摩柠檬酸杆菌	+	+	−	+	−	+	−
吉伦柠檬酸杆菌	−	−	+	V	−	V	−
克氏柠檬酸杆菌	+	+	+	V	V	−	+
莫林柠檬酸杆菌	−	Unk	Unk	−	+	+	−
巴斯德柠檬酸杆菌	+	−	−	V	+	V	−
啮齿类柠檬酸杆菌	−	+	+	−	−	−	−
塞氏柠檬酸杆菌	V	+	+	−	++		−
乌克曼柠檬酸杆菌	−	−	+	−	−	−	−
杨氏柠檬酸杆菌	V	−	−	V	+	−	−

注：[a]+. ≥85%；V. 15%~84%；−. <15%。[b] 商品化鉴定系统的发酵反应，应该类似常规发酵肉汤(带有指示剂肉汤中含有 1%碳水化合物)

表 40-4 成团泛菌和肠杆菌属、莱略特菌属、多源杆菌属、小坂菌属菌鉴别[a,b]

来源和菌名	赖氨酸脱羧酶	精氨酸双水解酶	鸟氨酸脱羧酶	VP	产酸[c]							黄色色素
					蔗糖	侧金盏花醇	D-山梨醇	L-鼠李糖	α-甲基D-葡糖苷	七叶苷	蜜二糖	
人类分离菌												
成团泛菌	−	−	−	V	V	−	V	V	−	V	V	V
河生肠杆菌	−	−	V	+	+	−	−	+	V	+	+	−
阿氏肠杆菌	−	V	+	−	+	−	+	−	+	+	−	−
生癌肠杆菌	−	+	+	+	−	−	−	+	−	+	−	−
阴沟肠杆菌阴沟亚种	−	+	+	+	+	V	+	+	V	V	+	−
霍氏肠杆菌霍氏亚种	−	V	+	+	+	−	−	+	V	−	−	−
神户肠杆菌	−	+	+	−	+	−	+	+	+	V	+	−
考文小坂菌[d]	−	−	−	+	+	−	+	+	−	+	+	V
日勾维多源杆菌	+	−	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−
环境分离株												
阴沟肠杆菌溶解亚种	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−
促根生小坂菌	−	+	−	+	+	−	+	+	−	+	−	−
河生莱略特菌	−	V	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−
超压莱略特菌	−	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−
梨多源杆菌[e]	+	−	+	+	+	−	−	+	−	+	+	−

注：[a] 路氏肠杆菌、霍氏肠杆菌斯氏亚种和霍氏肠杆菌欧哈拉亚种鉴别参见正文。[b]+. ≥90%；V. 11%~89%；−. ≤10%。[c] 见表 40-3 注释[b]。[d] 丙二酸盐阴性，发酵山梨醇可与成团泛菌区别[31]。[e] 氰化钾试验阳性、肌醇阳性可与日勾维多源杆菌区别

表 40-5　克雷伯菌属和拉乌尔菌属部分菌种生化特征[a,b]

菌名	吲哚	鸟氨酸脱羧酶	VP	丙二酸盐	ONPG	生长		D-松三糖产酸[c]
						10℃	44℃	
解鸟氨酸拉乌尔菌	+	+	V	+	+	+	NA	NA
产气克雷伯菌	−	+	+	+	+	+	−	−
产酸克雷伯菌	+	−	+	+	+	−	+	−
肺炎克雷伯菌臭鼻亚种	−	−	−	−	V	NA	NA	NA
肺炎克雷伯菌[d]	−	−	+	+	+	−	+	−
植生拉乌尔菌	V	−	+	+	+	+	−	−
土生拉乌尔菌	−	−	+	+	+	+	−	+
鼻硬结克雷伯菌	−	−	−	+	−	NA	NA	NA

注：[a] 新加坡克雷伯菌仅分离到单株细菌，生化反应不包括在此表。[b] ONPG，o-硝基苯基-β-D-吡喃半乳糖苷；+. ≥90%；V. 11%～89%；−. ≤10%；NA. 不明。[c] 见表 40-3 注释[b]。[d] 侧金盏花醇阴性提示为异栖克雷伯菌，但必须通过 *rpoB* 测序确认[39]

表 40-6　沙雷菌属菌种生化特征[a,b]

菌名	赖氨酸脱羧酶	鸟氨酸脱羧酶	丙二酸盐	产酸[c]								红色色素	气味
				阿拉伯糖	L-鼠李糖	D-木糖	蔗糖	侧金盏花醇	D-山梨醇	纤维二糖	D-阿拉伯糖醇		
嗜虫沙雷菌[d]	−	−	−	−	−	V	+	−	−	−	V	−	−
无花果沙雷菌	−	−	−	+	V	+	+	−	+	+	+	−	V
居泉沙雷菌	+	+	V	+	V	V	V	+	+	−	+	−	−
液化沙雷菌群	+	+	−	+	V	+	+	−	+	−	−	−	−
黏质沙雷菌黏质亚种	+	+	−	−	−	−	+	V	+	−	−	V	−
黏质沙雷菌生物群 1	V	+	−	−	−	−	+	V	+	−	−	NA	−
气味沙雷菌生物群 1	+	+	−	+	+	+	+	V	+	+	−	−	+
气味沙雷菌生物群 2	+	−	−	+	+	+	−	V	+	+	−	−	+
普利茅斯沙雷菌[e]	−	−	−	+	−	+	+	−	V	V	−	+	−
深红沙雷菌	V	−	+	+	−	+	+	+	−	+	V	+	−

注：[a] 据报道黏质沙雷菌佐久亚种可形成芽胞；解脲沙雷菌脲酶阳性，仅分离到 1 株。[b] +. ≥90%；V. 11%～89%；−. ≤10%；NA. 无结果。[c] 见表 40-3 注释[b]。[d] 37℃生长，但 30℃生化反应最典型。[e] 37℃可能不生长

表 40-7　变形杆菌属、普鲁威登菌属、摩根菌属菌种生化特征[a]

菌名	靛基质	硫化氢	脲酶	鸟氨酸脱羧酶	产酸[b]				
					麦芽糖	D-侧金盏花醇	D-阿拉伯糖醇	海藻糖	肌醇
变形杆菌属									
豪萨变形杆菌	+	V	+	−	+	−	−	+	−
奇异变形杆菌	−	+	+	+	−	−	−	+	−
潘氏变形杆菌	−	V	+	−	+	−	−	V	−
普通变形杆菌[c]	+	V	+	−	+	−	−	V	−
普鲁威登菌属									
产碱普鲁威登菌	+	−	−	−	−	+	−	−	−
海氏普鲁威登菌	−	−	−	−	V	+	+	−	V
雷氏普鲁威登菌	+	−	+	−	−	+	+	−	+
拉氏普鲁威登菌	+	−	−	−	−	−	−	−	−
斯氏普鲁威登菌	+	−	V	−	−	−	−	+	+
摩根菌属									
摩根摩根菌摩根亚种	+	−[d]	+	+[e]	−	−	−	−	−
摩根摩根菌西伯尼亚种	V	−[d]	+	V[e]	−	−	−	+	−

注：[a] +. ≥90%；V. 11%～89%；−. ≤10%。[b] 见表 40-3 脚注[b]。[c] 普通变形杆菌基因种 4、5 和 6 表型无法区分。[d] 某些生物群部分菌株产 H_2S。[e] 某些生物群部分菌株鸟氨酸脱羧酶阴性

表 40-8 西地西菌属与部分肠杆菌属和克洛诺杆菌属菌种鉴别(VP、精氨酸双水解酶、鸟氨酸脱羧酶可变或阳性)[a]

菌名	产酸[b]					
	D-山梨醇	棉子糖	L-鼠李糖	蜜二糖	D-阿拉伯糖醇	蔗糖
戴维斯西地西菌	−	−	−	−	−	+
拉帕西地西菌	−	−	−	+	+	−
阪崎克洛诺杆菌	−	+	+	+	−	+
生癌肠杆菌	−	−	+	−	−	−
阴沟肠杆菌	+	+	+	+	V	−

注:[a]+. ≥90%;V. 11%～89%;−. ≤10%。[b]见表 40-3 脚注[b]

表 40-9 克吕沃尔菌属与常见吲哚阳性、VP 阴性菌种鉴别[a]

菌名	枸橼酸盐	脲酶	赖氨酸脱羧酶	氰化钾
克吕沃尔菌属[b]	−	−	+	+
克氏柠檬酸杆菌	+	V	−	−
摩根菌属	−	+	−	+
普鲁威登菌属	V	+	−	+
大肠埃希菌	−	−	+	−

注:[a]+. ≥90%;V. 11%～89%;−. ≤10%;勒克菌属和迟钝爱德华菌吲哚阳性,VP 阴性. 见表 40-10,表 40-12。[b]包括中间克吕沃尔菌(*K. cochleae* and *Enterobacter intermedius* combined)[196]

表 40-10 临床标本中赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶和精氨酸双水解酶阴性的不常见肠杆菌科细菌鉴别[a]

菌名	动力	葡萄糖产气	氰化钾	VP	产酸[b]		
					蔗糖	L-阿拉伯糖醇	海藻糖
欧文菌属	V	−	−	+	−	−	+
勒克菌属	+	+	+	−	+	+	+
米勒菌属	+	+	V	−	−	+	+
拉恩菌属	−	+	−	+	+	+	+
塔特姆菌属	−	−	−	−	+	−	+
非共生光杆状菌[c]	+	−	−	−	−	−	−

注:[a]+. ≥90%;V. 11%～89%;−. ≤10%,布戴维采菌赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶和精氨酸双水解酶阴性,见表 40-12。[b]见表 40-3 脚注[b]。[c]非共生光杆状菌南半球亚种发酵麦芽糖和甘油,可与非共生光杆状菌非共生亚种鉴别

表 40-11 预研菌属和哈夫尼亚菌属鉴别[a]

菌名	VP	丙二酸盐	枸橼酸盐	产酸[b]	
				蜜二糖	甘油
预研菌属	−	−	+	+	−
蜂房哈夫尼亚菌	+	+	−	−	+
副蜂房哈夫尼亚菌	+	−	V	−	+

注:[a]+. ≥90%;V. 11%～89%;−. ≤10%。[b]见表 40-3 脚注[b]

表 40-12　肠杆菌目产硫化氢菌种的鉴别[a]

菌名	赖氨酸脱羧酶	鸟氨酸脱羧酶	脲酶	L-阿拉伯糖产酸[b]	枸橼酸盐利用	氰化钾	ONPG
勒米诺菌属	−	−	−	+	V[c]	−	−
迟钝爱德华菌	+	+	−	−	−	−	−
水生布戴维采菌[d]	−	−	+	V	−	−	+
泉布拉格菌[d]	−	−	−	−	−	−	−
关岛特拉布斯菌[d]	+	+	−	+	V	+	+
沙门菌亚群 1	+	+	−	+	+	−	−
柠檬酸杆菌属	−	V	V	+	V	+	+
变形杆菌属	−	V	+	−	V	+	−

注：[a] ONPG，o-硝基苯基-β-吡喃半乳糖苷；+．≥90%；V．11%～89%；−．≤10%。[b] 见表 40-3 脚注[b]。[c] 格氏勒米诺菌阳性；里氏勒米诺菌阴性。[d] 分离自临床标本但临床意义不确定

表 40-13　肠杆菌目细菌产生的 β-内酰胺酶

β-内酰胺酶	Ambler 分类	克拉维酸耐药	底物	代表酶	定位	细菌	实验室检测
ESBLs	A	S	青霉素类，窄谱和超广谱头孢菌素，氨曲南	TEM-3 及其他（>130），SHV-2 及其他（>50），CTX-M	质粒	克雷伯菌、黏质沙雷菌、肠杆菌属、变形杆菌属、弗劳地柠檬酸杆菌、摩根摩根菌	头孢泊肟筛选，双纸片法，BMD，CTX 和 CAZ±克拉维酸或 CPD±克拉维酸 E 试验条，显色培养基，自动化仪器，PCR
头孢菌素酶	C	R	超广谱 β-内酰胺类、头霉素、氨曲南	AmpC 酶（CMY，MOX，FOX，DHA）	质粒	肺炎克雷伯菌，部分大肠埃希菌	CAZ 和 FOX 诱导试验，其余同上
					染色体	肠杆菌属、弗劳地柠檬酸杆菌、黏质沙雷菌、变形杆菌属、摩根摩根菌	
碳青霉烯酶	A	S/R	所有 β-内酰胺类，氨曲南	KPC	质粒	克雷伯菌属、肠杆菌属、黏质沙雷菌、其他菌属	BMD、自动化仪器、E 试验、ETP 纸片法、KPC 科马嘉显色平板、EDTA 纸片法、MHT、MER 纸片±PBA、PCR
				GES	质粒	肺炎克雷伯菌	
				SME，IMI，NMC	染色体	肠杆菌属、黏质沙雷菌	
	B	R	所有 β-内酰胺类	IMP，VIM	质粒或染色体	肺炎克雷伯菌、黏质沙雷菌、肠杆菌属、柠檬酸杆菌属	IMI ± EDTAE 试验条，IMI ± EDTA 纸片法，MER ± EDTA 纸片法，mCIM，CarbaNP，PCR
	D	R	青霉素类，碳青霉烯类	OXA-48，OXA-181	质粒	肺炎克雷伯菌	筛选：碳青霉烯类 I 或 R（2013 年 CLSI 折点）；替莫西林耐药；mCIM，eCIM；分子生物技术

注：S. 敏感；R. 耐药；BMD. 微量肉汤稀释法；eCIM. EDTA 改良碳青霉烯灭活试验；mCIM. 改良碳青霉烯灭活试验；TEM. 来源于患者名字；SHV. 巯基试剂变量；CTX-M. 针对头孢噻肟，分离自慕尼黑；CMY. 针对头霉素；MOX. 针对拉氧头孢；FOX. 针对头孢西丁；DHA. 来自达哈兰（Dhahram）；KPC. 肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶；GES. 圭亚那（Guiana）超广谱；SME. 黏质沙雷菌酶；IMI. 水解亚胺培南 β 内酰胺酶；NMC. 非金属型碳青霉烯酶；IMP. 针对美罗培南；VIM. 维罗纳（Verona）整合子编码的金属 β-内酰胺酶；CTX. 头孢噻肟；CAZ. 头孢他啶；CPD. 头孢泊肟；ETP. 厄他培南；MER. 美罗培南；A 类和 C 类为丝氨酸酶，B 类为金属酶（根据水解 β-内酰胺环酶活性中心存在丝氨酸残基或需要锌离子命名），参考文献[8][208][218][221][270]

值得注意的是，使用商品化的表型方法鉴定系统鉴定不同菌属时会遇到不同的问题。商品化表型鉴定系统结果为“低鉴定率”的菌株，附加生化试验可显著提高鉴定准确率。尽管在商品化表型鉴定系统数据库中也包括本章所涉及的少见肠杆菌目细菌，但在验证性研究中使用的菌株数非常有限，因此，商品化表型鉴定系统对这些细菌的鉴定准确率仍然所知甚少[142]。2005 年的一篇文献对用于临床实验室的手工与自动化细菌鉴定方法进行了综述[142]，详细描述了所有的反应底物与附加试剂，并对每一个商品化鉴定系统的质量控制、数据库内容、鉴定准确性、重要特征和相关评估文献进行了详细论述，但没有包括最新的分类[139]。即使是新的鉴定系统，临床实验室也不应仅依靠商品化鉴定系统，而应同时结合菌落形态、药敏数据，以及菌株分离的解剖部位进行考虑。

MALDI-TOF MS 除了用于鉴定外，还可用于细菌分型和药物敏感性分析。尽管已有较多的研究发表，但这些方法尚未在大多数实验室中常规使用。该领域的进一步研究还在进行中。

(一)克雷伯菌属和拉乌尔菌属

与化脓性肝脓肿相关的肺炎克雷伯菌 CC23[K1] 能利用 D-核糖、3-羟基丁酸酯、D-塔格糖和卫矛醇作为单一碳源，可通过生化反应与 CC82[K1] 和 K2 型肺炎克雷伯菌鉴别[143]。产酸克雷伯菌吲哚阳性可与肺炎克雷伯菌鉴别[144]。肺炎克雷伯菌鼻硬结亚种通过靶向 PCR 或磷酸化孔蛋白基因(*phoE*)测序来鉴定[145]。区别类肺炎克雷伯菌、肺炎克雷伯菌和异栖克雷伯菌的关键生化反应是侧金盏花醇、L-山梨糖、3-丙酸苯酯、5-酮基-D-葡糖酸盐和三碳烯酸，在这些生化反应中，肺炎克雷伯菌仅侧金盏花醇阳性，异栖克雷伯菌侧金盏花醇和 3-丙酸苯酯阴性，其余 3 个阳性，类肺炎克雷伯菌三碳烯酸阳性，5-酮基-D-葡糖酸盐阴性，其余反应不定[35]。植生拉乌尔菌和土生拉乌尔菌需要温度生长试验和碳同化试验与克雷伯菌属鉴别，土生拉乌尔菌发酵 β-龙胆二糖可与植生拉乌尔菌区别。

(二)肠杆菌属和泛菌属

因为部分菌种存在遗传异质性，商品化系统鉴定肠杆菌属和泛菌属菌种较其他菌属更容易混淆[58,59]。路氏肠杆菌和霍氏肠杆菌，之前归于阴沟肠杆菌复合群，可通过 3-*o*-甲基-D-吡喃葡糖、腐胺和 3-羟基丁酸酯生长试验与阴沟肠杆菌鉴别[17,55]。新近描述的肠杆菌属菌种包括 Enterobacter bugandensis 和马赛肠杆菌的生化反应已公布[56,146]。有趣的是，尽管产气肠杆菌已重新分类至克雷伯菌属，但与其他克雷伯菌表型存在重大差异，包括动力阳性、鸟氨酸脱羧酶阳性和脲酶阴性[59]。出于实际原因，医疗系统经常将肠杆菌属多个菌种(阴沟肠杆菌、阿氏肠杆菌、霍氏肠杆菌、神户肠杆菌、路氏肠杆菌和超压肠杆菌)报告为阴沟肠杆菌复合群，因为它们具有相似的生化反应和临床意义，多个鉴定系统可能无法区分复合群内的菌种[48,147]。商品化系统或常规生化反应均难以鉴定成团泛菌[142,148]。产黄色色素、赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸阴性菌株，应怀疑是成团泛菌，非脱羧勒克菌也有这些特点，但吲哚阳性可与成团泛菌鉴别[48]。除菠萝泛菌和斯氏泛菌产吲哚亚种外，大多数泛菌吲哚均阴性[57,149]。因泛菌属常规生化反应难以鉴别，对于不使用 MALDI-TOF MS 的实验室，应将分离的少见或不寻常菌种送到参考实验室确认。

(三)克洛诺杆菌属

克洛诺杆菌属可形成干燥或黏液型、光滑和不规则圆形或粗糙褶皱菌落，黏附在琼脂表面不易刮取。80%的菌株在室温下产生黄色色素。最初提出生物分型作为鉴定克洛诺杆菌的手段，但是，以 DNA 测序为基础的研究(包括 WGS)表明该生物分型方案与已知属的系统发育差异很大，故不再使用。根据 2007 年的分类修订，API20E 和 ID32E 商业试剂盒于 2015 年进行了更新，不再使用阪崎肠杆菌这个菌名。尽管有更新，但在一项研究中测试了 240 多株克洛诺杆菌，使用 AP20E 和 ID32E 试剂盒鉴定到属的水平准确性仅为 43%和 82%[150]。鉴定至种的水平存在更多问题，在同一项研究中，VITEK GN 卡将所有克洛诺杆菌都鉴定为阪崎克洛诺杆菌群，不幸的是，弗朗科杆菌也会被鉴定为这个群。因此，市售的生化反应试剂盒尚不足以将克洛诺杆菌鉴定到种的水平。以 *ompA* 基因为靶点的 PCR 方法可以准确地鉴定出克洛诺杆菌，但只能鉴定到属水平。克洛诺杆菌属 16S rRNA 基因测序并非对所有菌

种鉴定都可靠，因为它们之间的亲缘关系特别紧密，特别是阪崎克洛诺杆菌和丙二酸克洛诺杆菌[76-77,151]。已开发了许多分子方法取而代之，其中最有用的是管家基因 *fusA* 测序，该基因是线上 MLST 方案(http://pubMLST.org/cronobacter)的一部分，并且其系统发育与全基因组系统发育相匹配[76]。

(四)沙雷菌属、柠檬酸杆菌属和泛菌属

除液化沙雷菌群，其他沙雷菌均易鉴定，该群菌种区分可联合使用 API 50 CH(碳水化合物)和 API ZYM(酶)(bioMérieux, Hazelwood, MO)板条[58]。数据库中柠檬酸杆菌以种或亚群形式存在，但亚群的鉴定还需通过标准方法作进一步的生化试验，这样会导致鉴定时间延长[58,95]。一种 L-焦谷氨酸试纸条(Oxoid 公司)用于检测吡咯烷酮肽酶，可用于区分生化反应不典型的柠檬酸杆菌(阳性)和沙门菌(阴性)[152,153]。柠檬酸杆菌新菌种与以往菌种的生化反应的比较已公布[95]。出于实际原因，临床经常将柠檬酸杆菌的多个种(布氏柠檬酸杆菌、弗劳地柠檬酸杆菌、吉伦柠檬酸杆菌、莫林柠檬酸杆菌、啮齿类柠檬酸杆菌、塞氏柠檬酸杆菌、乌克曼柠檬酸杆菌及杨氏柠檬酸杆菌)都报告为弗劳地柠檬酸杆菌复合群，因为这些菌种的生化反应和临床意义都非常相似，多个鉴定系统可能无法区分复合群内的菌种[94]。革兰阴性、氧化酶阴性在血琼脂平板上呈迁徙性生长，麦康凯琼脂平板上呈扁平边缘锥形的菌落，可报告为变形杆菌。吲哚阴性、氨苄西林敏感的菌株可报告为奇异变形杆菌，而吲哚阳性、氨苄西林耐药的菌株可报告为普通变形杆菌[154]。豪氏变形杆菌原为普通变形杆菌的一个亚群，水杨苷、七叶苷和海藻糖阴性可与普通变形杆菌区分[154]。不符合上述标准的变形杆菌必须通过商品化系统或常规生化反应进行全面鉴定[154]。变形杆菌属细菌商品化鉴定系统准确率 95%～100%，但普鲁威登菌鉴定准确率 79%～100%[154]。普鲁威登菌常被误鉴定为摩根菌属或变形杆菌属，尿素阳性的斯氏普鲁威登菌可能被误鉴定为雷氏普鲁威登菌，或者系统要求补充生化试验。摩根摩根菌摩根亚种(*Morganella morganii* subsp. *morganii*)用 2 h 快速鉴定方法错误率高达 66%，但是自动化鉴定系统如 VITEK 2(bioMérieux, Marcy-l'Étoile, 法国)和 MALDI-TOF MS，对这些菌能很好地鉴定至种水平[155-156]。

(五)其他肠杆菌目细菌

欧文菌属和塔特姆菌属生化反应不活泼，后者在体外生长较差。商业系统只能将克吕沃尔菌鉴定至属水平，鉴定到种需要抗坏血酸试验、氯苯酚敏感性和(或)气-液相色谱分析[58]。大多数商业化数据库中可能都不包括非共生光杆状菌。肠杆菌目的其他菌种在表 40-2 中列出，并附有参考文献以便获得更详细的信息。一些较新的 MALDI-TOF MS 数据库，尤其是科研数据库，比传统生化系统具有更广泛的可接受的菌种目录。菌种的分类在某个程度上是动态的，数据库需要经常更新，故实验室人员必须了解其系统如何处理不太常见的菌种。表 40-2 列出的大多数菌属和表 40-1 列出的部分菌属未包括在这些数据库中，或属内菌种可能无法鉴别。

(六)分子生物学鉴定

有关分子鉴定技术的信息参见第 7 章。对于许多实验室来说，对肠杆菌目进行鉴定的分子生物学方法主要有 2 种，即多重 PCR 和基因测序。用于检测胃肠道病原体商品化的多重 PCR 通常无法鉴定本章所述的菌种。用于鉴定阳性血培养的多重 PCR 组合可以鉴定许多肠杆菌及选定的耐药标志物(可信度高)[157]。这些方法无法鉴别少见的菌种或者难以鉴定其他来源的菌种。许多实验室利用部分 16S rRNA(约 500 bp)基因测序来鉴定肠杆菌，为此临床和实验室标准化委员会(CLSI)提供了有用的信息，包括建议百分比鉴定分数的临界值(cutoff 值)和鉴定算法指南[158]。公共数据库和商业数据库均可提供用于评估和比较的基因序列数据。常用的公共数据库包括 NCBI、RDPII(https://rdp.cme.msu.edu/)和 leBIBI(https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi)。

七、分型系统

在肠杆菌引起的医院内感染暴发中，追踪医院病原菌的传播能力已成为实验室的主要职责。本手册第 10 章和第 11 章提供了肠道感染暴发分

子流行病学有用的信息。分子技术包括质粒分析、核糖体分型、脉冲场凝胶电泳(PFGE)及各种PCR方法,都有令人满意的分辨能力,采用哪种方法取决于暴发的细节,某些分析技术可能比另外一些更适合某类菌属或菌种[159]。

如前所述,MLST是基于序列的分型方法,非常适合随时间的推移来追溯某些克隆或ST型别,并显示细菌之间共同的祖先谱系[9,160]。MLST已鉴定出某些国际流行的肺炎克雷伯菌ST型,如携带*CTX-M*基因的ST16型[161],携带*KPC*基因的ST258型[162-163],以及引起新生儿脑膜炎的阪崎克洛诺杆菌ST4型[76]。有3个开放的全球MLST数据库,即http://pubMLST.org、http://bigsdb.pasteur.fr/和 http://www.mlst.net,可覆盖越来越多的微生物。MALDI-TOF MS已成为某些菌种快速可靠的潜在分型方法。最近研究表明,对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,质谱技术的性能可与脉冲场凝胶电泳分型相媲美[164],但对于其他菌种,如肺炎克雷伯菌还存在问题[165]。还需对MALDI-TOF MS的鉴别性能进行深入研究。

全基因组测序(WGS)的高分辨率使之有能力快速识别菌株间的单核苷酸多态性,也使得有可能在感染暴发时重建和重新定义传播途径[162]。在过去的5年中,关于使用WGS进行感染暴发调查的文章增加了30倍。一个突出的例子,Snitkin及其同事应用WGS技术深入研究了一例虽已在早期采取了感染控制措施,但碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌仍然引起感染暴发的原因[166]。综合基因组学和流行病学分析,他们追溯到感染暴发来自同一患者3项独立的传播,该患者出院3周后下一例患者才出现临床症状,也找到了一些意想不到的传播途径。从此,WGS已用于研究全球其他多重耐药克雷伯菌的暴发感染[167-169],包括最近的一起黏菌素耐药CRKP感染暴发案例,涉及黏菌素耐药的突变发展和传播[169]。因此,如 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens 所示,基因组数据和流行病学数据的整合可能有助于实时监控医院传播。降低成本和更友好的生物信息系统,可能会促使在不久的将来将WGS作为感染暴发调查的新的金标准。

八、抗菌药物敏感性

无药可用的泛耐药肺炎克雷伯菌的出现,意味着肠杆菌科细菌耐药性的增加已达顶峰(表40-13)[170,171]。虽然肺炎克雷伯菌是最严重的威胁,但产酸克雷伯菌、黏质沙雷菌、肠杆菌属、变形杆菌属、摩根菌属和柠檬酸杆菌属也已报道可产生一种或多种Ambler分类中的β-内酰胺酶,表40-13总结了这些酶的特性。

肠杆菌目部分菌种产新型β-内酰胺酶的比例持续增加,这些新型β-内酰胺酶包括超广谱β-内酰胺酶(ESBL)、质粒介导的AmpC酶及碳青霉烯酶。碳青霉烯酶进一步细分为A类酶(KPC酶)、B类酶(如金属-β-内酰胺酶)和D类酶(苯唑西林酶如OXA-48样酶)[172-174]。通常,编码这些酶的质粒还带有氨基糖苷类、喹诺酮类和其他抗菌药物的耐药基因[175]。最近,报道了肠杆菌中由质粒介导的对多黏菌素耐药的*mcr*基因[176]。超过30个国家/地区的动物、人类和环境分离株中已鉴定出*mcr*-1基因,它最常见于大肠埃希菌,气单胞菌、克雷伯菌和沙门菌也有*mcr*的报道[177]。自2016年首次报道*mcr*-1以来,已鉴定出*mcr*-1的6个变异体和3个其他可移动的黏菌素耐药基因——*mcr*-2、*mcr*-3和*mcr*-4[177,178]。这表明耐药情况严重,因为多黏菌素通常是治疗碳青霉烯耐药菌株感染的最后防线[176]。

实验室检出耐药菌是合理管理患者、预防和控制感染的关键步骤。检测这些产新型β-内酰胺酶的菌株,无论其临床意义还是控制院内和医院间传播都是临床实验室需要优先考虑的,但是由于这些酶检测困难又缺乏标准的方法,常规药敏试验通常难以识别这样的耐药株[179,180]。检测产新型β-内酰胺酶菌株的方法大致可以分为2类:第1类是表型检测,实质上是检测β-内酰胺酶对不同头孢菌素类和(或)碳青霉烯类的水解能力,以及不同酶抑制剂对酶活性的抑制能力。总的来说,表型检测方法成本低且操作简单,已在大多数临床微生物实验室推广应用。第2类是基因检测,利用分子生物学技术检测β-内酰胺酶的编码基因,与表型检测方法比较,分子生物学技术相对昂贵,在大型参考实验室或研究型实验室应用较多,并且通常只局限于某些特定的靶基因,而已知的与抗菌药物耐药相关的基因已有数百种。常规药敏和专门的表型检测方案在本书其他章节中有介绍(第72～74章)。

(一)肠杆菌目产ESBL菌株的实验室检测

ESBL鉴定通常依据2点:一是对氧亚氨基β-内酰胺类(即头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松或头孢吡肟)耐药,二是β-内酰胺酶抑制剂(如克拉维酸)可以抑制其活性。2009年以前,美国CLSI公布了针对大肠埃希菌、克雷伯菌属和奇异变形杆菌ESBL检测的指南[181]。该指南包括用于初筛试验的β-内酰胺类抗菌药物(头孢泊肟、头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松)和(或)氨曲南,用于确证试验的抗菌药物有头孢他啶和头孢他啶+克拉维酸、头孢噻肟和头孢噻肟+克拉维酸[181]。也可以用ESBL E试验条(Etest,梅里埃)和含β-内酰胺类和各种酶抑制剂组合的市售药敏纸片。自动化仪器检测原理相似,在临床实验室应用越来越广泛,包括VITEK 2(bioMérieux, Durham, NC)、Phoenix(Becton Dickinson)和MicroScan(Siemens Healthcare Systems, West Sacramento, CA)[182-183]。自动化系统检测敏感性很好,但性能可能还存在问题,有报道VITEK 2 ESBL检测出现假阳性,这可能会导致碳青霉烯类过度使用[184-185]。此外,在这些自动化系统上进行ESBL测试仅适用于大肠埃希菌、克雷伯菌和变形杆菌属,但还有更多的肠杆菌也携带*ESBL*基因[186]。因此,当自动化系统检测出产ESBL可疑菌株时,使用手工方法进行确认可能是明智的选择[183-185,187]。

2010年,美国CLSI更改了有关ESBL检测的建议[181]。现在,美国CLSI建议临床实验室使用当前的解释折点,根据测试结果报告头孢菌素敏感性而不必考虑是否存在ESBL。换句话说,在已证实ESBL存在的情况下,实验室不再将结果修改成耐药[181]。该建议进行修订的原因是降低了头孢菌素的折点,通过MIC更能检测到真正的耐药。因此,ESBL测试现在是可选项,但对于流行病学或感染控制而言仍可能有用;须注意,对于未采用新折点的实验室,仍需像以前一样执行测试和修正报告。

对大肠埃希菌、克雷伯菌和奇异变形杆菌以外的细菌进行ESBL的表型检测仍然是一个有争议的问题[180,182,183]。原因之一是,克拉维酸对ESBL的抑制作用可能被细菌(如肠杆菌属、柠檬酸杆菌属和沙雷菌属)产生的其他类型β-内酰胺酶(如AmpC)所掩盖。为了克服这个问题,某些表型检测药敏纸片和Etest组合使用头孢吡肟和β-内酰胺酶抑制剂[188-189]。一种较新的方法,氨曲南联合克拉维酸也可以准确检测ESBL的存在,特别是针对合并产AmpC或金属β-内酰胺酶的菌株[190]。另一个问题是ESBL的数量和异质性,有数百种具有不同底物特异性的ESBL。例如,CTX-M型酶对头孢噻肟的水解能力大于头孢他啶。这对仅使用一种β-内酰胺类抗菌药物来筛查ESBL的实验室会造成混淆。

分子方法检测ESBL的敏感性高,且针对最常见的类型——TEM、SHV和CTX-M[191]。有几种商业DNA芯片和实时PCR方法可用于检测不同类型的ESBL,包括TEM、SHV和CTX-M型[192]。有些直接用于检测血液培养物,可在1 h左右获得多个靶基因的结果[193]。

一种直接检测患者筛查标本中产ESBL菌株的简便方法是使用选择性培养基(如MacConkey和Drigalski琼脂),其中含不同浓度的头孢噻肟和(或)头孢他啶。已有商品化的双平板,如BLSE琼脂(法国,布鲁兹的AES Chemunex)和EbSA ESBL琼脂(荷兰,阿姆斯特尔芬,AlphaOmega B. V.)[194]。也可以使用显色培养基,同时进行菌种鉴定和推测ESBL。当前可用于检测ESBL的显色培养基包括chromID ESBL(bioMérieux)、Brilliance ESBL(英国贝辛斯托克Oxoid)和CHROMagar ESBL(法国巴黎CHROMagar)[194](第20章)。显色培养基对产ESBL细菌的检测敏感性很高,特别是预富集之后再使用,而特异性取决于评估中使用的革兰阴性细菌[195]。使用快速生化方法检测菌落,甚至可以更快地获得结果(数小时之内),如Rapid ESBL NDP(Nordmann/Dortet/Poirel)测定、β-Lacta方法(Bio-Rad, Marnes-la-Coquette)(法国)和Rapid ESBL Screen 98022(Rosco Diagnostica, Axonlab AG,瑞士巴登)[196]。但是,这些方法检测ESBL的准确性各不相同,尤其是同时存在AmpC或碳青霉烯酶。

(二)肠杆菌目产AmpC菌株的实验室检测

产诱导型AmpC头孢菌素酶的肠杆菌目细菌,如肠杆菌属、弗劳地柠檬酸杆菌、黏质沙雷菌、摩根摩根菌和斯氏普鲁威登菌,可高产染色体介导的AmpC酶,导致对氧亚氨基头孢菌素(如头孢

噻肟、头孢曲松和头孢他啶)、7-α-甲氧基头孢菌素(头霉素类如头孢西丁、头孢替坦)及单环酰胺类(如氨曲南)耐药[197]。感染这些细菌的患者使用β-内酰胺类药物可导致治疗失败[198]。这些酶编码基因位于上述细菌的染色体上,实验室对这些酶未常规开展检测。有多种方法可以检测AmpC酶,通过表型方法筛选出头霉素的耐药性(如头孢西丁和头孢替坦),然后使用AmpC酶抑制剂如苯硼酸(PBA)或氯唑西林进行确认[199]。筛选头孢西丁(>16 μg/ml)耐药菌株,然后使用头孢替坦与抑制剂PBA纸片进行确认试验,这种方法已在某些临床实验室推广[200]。多重PCR和实时PCR方法可用于检测质粒介导的不同类型的AmpC酶[201,202],已有商品化的实时PCR和DNA芯片用于检测这些酶。结合表型(头孢西丁筛查)和分子方法具有最高的敏感性和特异性[203]。

克雷伯菌属、沙门菌属和奇异变形杆菌缺乏染色体介导的AmpC酶,其AmpC酶往往是质粒介导[204]。头孢西丁常用于筛查AmpC酶,但头孢西丁敏感性减低也可能是外膜孔蛋白丢失所致,使得识别产AmpC酶菌株更复杂化[205]。错误的报告产AmpC酶菌株,可能导致不必要地使用碳青霉烯类,增加对碳青霉烯类耐药的风险[205],但对头孢西丁中敏或敏感性降低仍是AmpC存在的有用指标,提示需要进一步检测[205]。目前CLSI尚未推荐克雷伯菌属、大肠埃希菌、奇异变形杆菌或沙门菌属AmpC酶的检测指南。须注意,与产碳青霉烯酶菌株类似,AmpC酶可以通过其他耐药机制来增强耐药性,如合并膜孔蛋白改变而导致碳青霉烯类耐药[206]。但这种耐药表型的临床意义仍有疑问,因为尽管体外MIC升高,但体内模型证实碳青霉烯能有效杀灭含有质粒AmpC酶和膜孔蛋白改变的肺炎克雷伯菌[207]。

(三)肠杆菌目产碳青霉烯酶菌株的实验室检测

肠杆菌获得性碳青霉烯酶可分为3类(表40-13),包括A类酶(如KPC、SME、IMI和NMC-A)、B类酶(金属酶,如VIM、IPM和NDM)及D类酶(苯唑西林酶,如OXA-48类)[197,208]。CLSI降低了碳青霉烯类的折点,使用新折点,大部分产碳青霉烯酶菌株至少对一种碳青霉烯类非敏感。目前,CLSI关于产碳青霉烯酶菌株的建议与产ESBL菌株相似,即使用当前折点,β-内酰胺类药敏结果按照测试结果报告,无须根据产碳青霉烯酶结果进行修正[181]。但如果实验室使用旧的碳青霉烯折点,则必须进行确证试验,如果检测到碳青霉烯酶,需将β-内酰胺类敏感结果报告为耐药。

对于使用当前折点的实验室,CLSI建议碳青霉烯酶确证试验仅用于流行病学和感染控制目的。此建议尚有争议,因为与非产碳青霉烯酶的碳青霉烯耐药肠杆菌相比,产碳青霉烯酶肠杆菌感染的病死率更高[209]。而且,某些抗菌药物仅对某些类型碳青霉烯酶有效。例如,头孢他啶/阿维巴坦通常对产KPC菌株有效,但对产金属β-内酰胺酶菌株无效[210]。因此,有观点认为临床样本中存在碳青霉烯酶的信息会影响实验室的解释和临床医生的治疗决策。

有几种表型确证方法可以用于检测产碳青霉烯酶菌株,包括生物方法检测酶对碳青霉烯类的水解能力(如改良Hodge试验,目前已不推荐)[211]、间接碳青霉烯酶试验[181]、Carba NP试验[181]和改良碳青霉烯灭活试验(mCIM)[212],以及基于抑制剂的方法[金属螯合剂检测金属酶(如金属酶E试验)和苯硼酸(PBA)检测KPC酶][213-214]。重要的是要注意,部分方法存在敏感性或特异性的问题,这取决于所测试的特定碳青霉烯酶类型。例如,改良Hodge试验最近已从CLSI认可的碳青霉烯酶检测方法中剔除,因为该方法对检测KPC以外的碳青霉烯酶性能较差,以及在产AmpC酶菌株中存在较多的假阳性[215]。MAST Group Ltd.和Rosco Diagnostica发布了包含美罗培南和不同酶抑制剂的商品化纸片和Sensitabs,用于检测产碳青霉烯酶菌株[216]。这些基于抑制剂的检测方法不仅可以检测,还可以区分特定的碳青霉烯酶,其基础是不同的抑制剂抑制不同类型的碳青霉烯酶。

Nordmann及其同事应用Carba NP Ⅱ检测了97株产不同碳青霉烯酶的菌株[214],该表型方法基于检测亚胺培南水解后引起的酸化,联合他唑巴坦和EDTA作为抑制剂。结果表明,Carba NP Ⅱ试验是一种简易、可靠的方法,能检测和区分肠杆菌不同菌种的碳青霉烯酶,敏感性和特异性均为100%[217]。鉴于其优异的性能,美国CLSI认可Carba-NP用于检测碳青霉烯酶。但是,它对

OXA-48型碳青霉烯酶检测敏感性较差，且需要专用的试剂，并非在所有实验室都可用。最近，mCIM也得到了CLSI的认可。mCIM将美罗培南与测试菌株一起孵育，然后将美罗培南纸片贴在含有敏感指示菌的琼脂上。在一项多中心研究中，该方法的平均敏感性和特异性分别为97.1%和99.4%[218]。而且，尽管需要过夜孵育，但它不需要特殊的试剂且易于执行。值得注意的是，除了Carba NP Ⅱ试验外，Carba NP和初期的mCIM都无法区分碳青霉烯酶类型。2018年CLSI指南介绍了EDTA改良碳青霉烯灭活方法(eCIM)，该方法通过在部分检测中添加EDTA来区分丝氨酸酶与金属碳青霉烯酶。

碳青霉烯酶分子检测在临床实验室中变得越来越普遍。已有实验室自建多重PCR技术用于检测不同类型的碳青霉烯酶[191,219]。也有商品化的实时PCR和DNA芯片用于检测这些酶，Check-Direct检测法是其中一个例子(Check-Point，Wageningen，荷兰)，因其可提供不同的探针组合，故可根据选用的特定方法来检测许多耐药基因[191,192,220]。但是，执行起来很麻烦。相比之下，Carba-R分析法(Cepheid，加利福尼亚州森尼韦尔)可以在Cepheid Gene Xpert平台1 h内检测多个碳青霉烯酶基因，使用单个样本盒，且不需要太多的实验技巧。

也有一些检测方法可以直接从血液培养物中快速检测碳青霉烯酶基因，包括Verigene革兰阴性血液培养试验(Nanosphere)和FilmArray血液培养鉴定板(BioFire Diagnostics，盐湖城，犹他州)[60]。但许多此类分子测定法仅能检测一个或几个基因。这在流行不同或多个耐药基因的地区可能会受到限制。如果是阴性结果，可能会导致错误的安全感。快速和高敏感性的分子方法可以作为传统药敏试验方法的补充，但不能取代MIC测定。表型分析对于确定抗菌药物对细菌的实际活性非常有价值。此外，成本也是临床实验室常规开展分子方法的限制因素。

几种用于筛选碳青霉烯耐药菌的选择性商品化显色培养基也已进入临床，包括chromID CARBA(bioMérieux)、CHROMagar KPC(也有现成的培养基，称为Colorex KPC)、Brilliance CRE(Oxoid)和Hardy CHROM碳青霉烯酶(Hardy Diagnostics，加利福尼亚州圣玛丽亚)(第20章)。这些CHROMagar培养基既可以推测耐碳青霉烯菌株或产碳青霉烯酶，还可做菌种鉴定[194]。显色培养基对检测产碳青霉烯酶菌株的敏感性和特异性很高，并且已对几种类型的标本(粪便、呼吸道、尿和伤口)进行了评估[194]。CDC还发布了使用肉汤培养基(5 ml胰蛋白酶大豆肉汤含一张10μg美罗培南药敏纸片或一张10μg厄他培南药敏纸片)来筛选耐碳青霉烯菌株的方法[221]。大多数微生物实验室都可轻松获得试验所需耗材，其敏感性与显色培养基相当。但是，此方法劳动强度大，特异性低，周转时间较慢(阴性标本最少2天，阳性标本时间更长)[222]。

另一类碳青霉烯酶检测试剂最近已经上市。侧流免疫层析法包括OXA-48 K-seT、KPC K-seT和Resist-3 O. K. N. 分析(Coris BioConcept，比利时Gembloux)。这些操作简便易行，只需几分钟即可从单个菌落中获得结果。这些方法敏感性和特异性都很高，但限于靶向的特异性酶。Resist-3 O. K. N. 可使用单个一次性试剂盒同时检测OXA-48、KPC和NDM酶[223]。

最后，MALDI-TOF MS作为一种工具也可以提供β-内酰胺酶(包括碳青霉烯酶)和菌种信息。该方法前景广阔，但目前缺乏用于临床实验室常规实施的标准化方案[224]。

最后，部分肠杆菌目细菌(如黏质沙雷菌和肠杆菌属)有时会产染色体介导的A类碳青霉烯酶(如SME、IMI-1和NMC-A)(表40-13)。此类分离菌不被视为感染控制的紧急事件[225]。但是，如果有临床提示(如重症监护病房或普通病房可能有暴发)，应将分离株转送至参考实验室进行进一步分析。值得注意的是，使用当前的CLSI折点，大多数产碳青霉烯酶肠杆菌对一种或多种碳青霉烯类不敏感，并且对一种或多种第3代头孢菌素耐药。但是，产SME和IMI的菌株可以对头孢菌素敏感[226]。

(四)其他肠杆菌目细菌的耐药性

并非所有耐药都是质粒介导的，也不是所有耐药都是酶对抗菌药物的水解，当然也不是所有耐药都针对β-内酰胺类。许多肠杆菌染色体上携带耐药基因，对某些抗菌药物天然耐药。此外，同一属内的不同菌种可能会表现出不同的整体耐药和天然耐药[227]。例如，奇异变形杆菌对呋喃妥

因、四环素和黏菌素天然耐药，但通常对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑、青霉素类、头孢菌素和氨基糖苷类敏感[228]。尽管大多数菌株对环丙沙星敏感，但滥用该药物也会产生耐药[229]。潘氏变形杆菌和普通变形杆菌的耐药性与摩根菌相似，对广谱头孢菌素、头孢西丁、头孢吡肟、氨曲南和氨基糖苷类敏感，对阿莫西林、氨苄西林、头孢唑林、头孢呋辛和呋喃妥因耐药。变形杆菌、普鲁威登菌和摩根菌通过非产碳青霉烯酶机制导致对亚胺培南 MIC 值升高，应报告这些菌株亚胺培南的检测结果。雷氏普鲁威登菌和斯氏普鲁威登菌对庆大霉素和妥布霉素耐药，但对阿米卡星敏感。尿分离株对广谱和超广谱头孢菌素、环丙沙星和甲氧苄啶-磺胺异噁唑敏感。

总体而言，肠杆菌目细菌对其他抗菌药物如大环内酯类天然耐药，但存在例外，如沙门菌属和志贺菌属对阿奇霉素敏感。CLSI 每年都会发布天然耐药表格，实验室应参考 CLSI M100 文件的附录 B 以获得此信息。重要的是，无论体外药敏结果如何，对天然耐药的抗菌药物都不应报告敏感[181]。

克雷伯菌属、肠杆菌属和沙雷菌属中少见菌种的敏感性结果与常见分离菌相似[230]。其他肠杆菌敏感性因菌种而异。在这种情况下，除非 CLSI M100 文件[181]列出了特定的例外情况，实验室可以使用肠杆菌科折点。此外，重要的是，该信息随着分类法的更新及出版文献的发展而变化。因此，必须每年对 M100 文件进行审查。

最后，其他耐药机制可能会混淆上述特定 β-内酰胺酶的检测。AmpC 酶合并膜孔蛋白丢失可以导致菌株对碳青霉烯类敏感性降低，而非存在碳青霉烯酶。此外，OXA 型 β-内酰胺酶的准确检测仅限于某些检测方法，而特定 OXA 酶的流行也因地区而异。因此，实验室应确定最适合本地区和实验室的筛选和确认检测方法。

九、结果的评价、解释和报告

本章所包括的菌种用商品化鉴定系统鉴定，如准确率很高（>90%），则鉴定结果往往是可靠的。但无菌部位分离株，如鉴定率<90%，则应采用传统方法或分子方法，或送有能力采用这些技术的参考实验室确认，其间实验室可以报告临床推测性的鉴定结果。本章介绍的菌种多为常见的病原菌，容易鉴定。鉴定率低的罕见菌种也应该送至参考实验室确认，同时附上临床明显感染的简要病史。

临床实验室作为早期预警系统，应提醒医学界及早注意临床重要细菌中出现新的耐药机制。实验室对耐药菌的检测是患者进行治疗、感染预防和控制的关键。越来越多感染或定植产 ESBL 和碳青霉烯酶肠杆菌的患者已成为这些酶在医疗机构内部和之间传播的感染源。提高鉴别这些菌株的能力不仅对患者治疗非常重要，而且对预防泛耐药菌株的产生也至关重要。

产碳青霉烯酶的克雷伯菌属和肠杆菌属的出现（尤其是质粒介导的）是感染控制的紧急情况，临床微生物实验室应有能力快速检测产酶的肠杆菌菌株[231]，这对患者治疗、感染预防和控制都非常关键。以 0.5 μg/ml 厄他培南及 1 μg/ml 美罗培南、亚胺培南或多利培南作为初筛，再进行表型确证试验，为快速检测碳青霉烯酶提供了一种经济、高效的方法。如前所述，已有许多表型和分子方法可用于筛查耐药的肠杆菌，还有研究也在进行中，希望能更详细地了解耐药质粒的水平转移机制和明确对控制耐药菌株在全球传播的最重要因素[232]。

参考文献请扫二维码查阅

第41章 耶尔森菌属

LUKE C. KINGRY，CHERYL L. TARR，JEANNINE M. PETERSEN

（曾吉　译；杨青、马筱玲　审校）

致病性耶尔森菌(*Yersinia*)，包括假结核耶尔森菌(*Y. pseudotuberculosis*)、小肠结肠炎耶尔森菌(*Y. enterocolitica*)和鼠疫耶尔森菌(*Y. pestis*)，是可引起人类感染的动物源性病原菌。耶尔森菌属包括这3种细菌和其他15种鲜为人知的耶尔森菌，其他这些菌种大多被认为是对人类无致病性的环境菌。摄入被假结核耶尔森菌和小肠结肠炎耶尔森菌污染的食物或水后，就会引起人类感染。临床表现包括胃肠炎、肠系膜腺炎和反应性关节炎。鼠疫是通过被鼠疫耶尔森菌感染的跳蚤叮咬而传播给人类并导致危及生命的疾病。鼠疫是一种烈性传染病，未经治疗其病死率可达50%～100%，曾引起世界3次大流行，其中包括14世纪的黑死病。在第2次世界大战期间及之后，美国、日本和苏联都曾将鼠疫耶尔森菌作为生物武器[1]；它被列为一级致病菌，位列被认为最具因蓄意滥用而可能引起大量人员伤亡或对经济、重要基础设施及公众信心造成毁灭性打击的危险巨大的6种细菌之一(https://www.federalregister.gov/documents/2012/10/05/2012-24389/possession-use-and-transfer-of-select-agents-and-toxins-biennial-review)。

一、分类学

耶尔森菌科属于变形菌门γ菌纲的肠杆菌目。耶尔森菌属包括3种具有临床意义的菌种，即鼠疫耶尔森菌、假结核耶尔森菌和小肠结肠炎耶尔森菌，以及其他15种被认为非致病性的耶尔森菌，包括中间耶尔森菌(*Y. intermedia*)、弗氏耶尔森菌(*Y. frederiksenii*)、克氏耶尔森菌(*Y. kristensenii*)、阿尔德沃耶尔森菌(*Y. aldovae*)、罗氏耶尔森菌(*Y. rohdei*)、莫氏耶尔森菌(*Y. mollaretii*)、伯氏耶尔森菌(*Y. bercovieri*)、阿列克西奇耶尔森菌(*Y. aleksiciae*)、帕氏耶尔森菌(*Y. pekkanenii*)、类似耶尔森菌(*Y. similis*)、沃特斯耶尔森菌(*Y. wautersii*)、鲁氏耶尔森菌(*Y. ruckeri*)、食昆虫耶尔森菌(*Y. entomophaga*)、马赛耶尔森菌(*Y. massiliensis*)和纳氏耶尔森菌(*Y. nurmii*)(www.bacterio.net/yersinia.html)。也有学者认为，沃特斯耶尔森菌应继续被分类为假结核耶尔森菌韩国亚型[2]。

NCBI提供了所有耶尔森菌种的完整基因组序列或基因组序列草图。完整的耶尔森菌基因组序列的大小范围为4.60～4.94 Mb，G+C含量范围为46.7%～47.7%(www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Yersinia)。所有耶尔森菌的基因组都是由一条染色体组成。此外，致病性耶尔森菌基因组还包含一个不到70 kb的毒力质粒(在鼠疫耶尔森菌中称为pCD1，在小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌中称为pYV)[3]。鼠疫耶尔森菌基因组还携带另外2个质粒(pMT1和pCP1)，而一些假结核耶尔森菌菌株则携带一个额外的质粒[4-5]。

基因组分析表明，鼠疫耶尔森菌是假结核耶尔森菌的一个近代克隆，在过去20 000年至1500年间出现，而小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌在过去的2亿年间就已分化[6-7]。鼠疫耶尔森菌和假结核耶尔森菌的全基因组拥有高度的基因相似性，其中假结核耶尔森菌的3974个预测基因中，有75%的基因与鼠疫耶尔森菌同源且一致性≥97%。把鼠疫耶尔森菌和假结核耶尔森菌作为2个不同的菌种是基于它们不同的发病机制、临床表现和传播方式[4,6]。

小肠结肠炎耶尔森菌是唯一被再分为亚种

的耶尔森菌。这 2 个亚种是小肠结肠炎耶尔森菌小肠结肠炎亚种（*Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica*）和小肠结肠炎耶尔森菌 *palearctica* 亚种（*Y. enterocolitica* subsp. *palearctica*）。两者 99%的核苷酸是一致的，但可通过 16S rRNA 进行鉴别[8]。

二、菌属描述

耶尔森菌属为革兰阴性无芽胞杆菌，非苛养菌。菌体相较其他细菌小（直径 0.5～0.8 μm，长度 1～3 μm），并且生长也比较缓慢。耶尔森菌是兼性厌氧菌，4～43 ℃均能生长。在致病性耶尔森菌中，小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌在低于 30 ℃时动力阳性，因具有端鞭毛或周鞭毛（表 41-1）。

脂多糖是细菌外膜的主要成分[9]。假结核耶尔森菌和小肠结肠炎耶尔森菌（光滑型）的脂多糖结构是完整的（脂质 A-寡糖核心-O 抗原多糖），这些菌种的 O 链变异是 O 群血清分型的基础[9-11]。相反，鼠疫耶尔森菌受限于碳水化合物短链，产生 R 型（粗糙型）脂多糖，并且在 37℃下丧失产生高酰基形式的脂质 A 的能力[12]。

致病性耶尔森菌一个关键特征是具有通过铁载体系统清除宿主铁的能力[13-14]。其他毒力基因包括 *yst* 基因，它是肠致病性小肠结肠炎耶尔森菌独有的热稳定毒素，在假结核耶尔森菌中不存在；以及 *invA* 基因，它是小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌共有的上皮细胞黏附基因[15-16]。侵袭素有助于细菌与肠黏膜细胞有效结合，并使其从管腔向派尔集合淋巴结（Peyer's patches）转移，鼠疫耶尔森菌的 *invA* 基因因插入元件使其失活[15]。脲酶的产生能使小肠结肠炎耶尔森菌在胃中存活并定植在人的小肠中。鼠疫耶尔森菌不产生脲酶。

致病性耶尔森菌菌种具有一个共同的且基因保守的 68～75 kb 毒力质粒，在鼠疫耶尔森菌中被称为 pCD1，在小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌中被称为 pYV。该质粒编码耶尔森菌Ⅲ型分泌系统的组分[17-19]。YadA 也是由耶尔森菌毒力质粒编码，在小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌中，这种黏附蛋白可促进病原体与肠道黏膜 M 细胞的结合，信号诱导内在化，随后移位至派尔集合淋巴结和肠系膜淋巴结[15]。在鼠疫耶尔森菌中，因 *yadA* 基因有一个核苷酸缺失，导致移码和产生一个无功能的蛋白质[15]。

鼠疫耶尔森菌 2 个特有的质粒编码重要的蛋白质，利于细菌利用跳蚤作为传播媒介并引起疾病。50～120 kb 质粒（pMT1）编码鼠毒素（Ymt）和 F1 抗原（F1）[5,17]。Ymt 仅在与跳蚤体温相当的温度（约 28℃）下表达，是一种磷脂酶，跳蚤的消化道在消化血液过程中会产生不利于细菌的恶劣环境，而磷脂酶的活性对于病原体能在这种环境中生存是必不可少的[20]。F1 仅在温度高于 33℃时才表达。F1 在细菌表面形成具有抗吞噬作用的荚膜状结构，有利于细菌的播散和复制[5]。由 10 kb 质粒（pCP1）编码的纤溶酶原激活剂，是一种表面蛋白酶，可激活哺乳动物纤溶酶原并降解补体，这对于细菌在鼠黑死病模型中的传播非常重要[5,17,21]。这 3 个质粒是鼠疫耶尔森菌完整毒力所需要的。

对另外 8 种耶尔森菌，阿尔德沃耶尔森菌、伯氏耶尔森菌、弗氏耶尔森菌、克氏耶尔森菌、中间耶尔森菌、莫氏耶尔森菌、罗氏耶尔森菌和鲁氏耶尔森菌全基因组测序未发现毒力相关质粒 pYV、pMT1 和 pCP1 的同源基因，以及致病性耶尔森菌染色体编码的高致病性岛（HPI）。发现所有 8 个菌种中均不存在额外的 16 种染色体蛋白簇，而这些簇是致病性耶尔森菌（鼠疫耶尔森菌，小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌）所共有的。这些菌种中的一些，特别是弗氏耶尔森菌、克氏耶尔森菌、中间耶尔森菌和莫氏耶尔森菌，常是从粪便标本中获得。由于致病性耶尔森菌属独有的基因，数量较少，因此，获得移动元件似乎是致病性耶尔森菌的主要特征[3]。

三、流行病学和传播

（一）鼠疫耶尔森菌

鼠疫是一种由鼠疫耶尔森菌引起的急性的，通常是致命性的疾病。该细菌自然生活史存在于野生啮齿动物与其跳蚤之间。感染人的最常见方式是被感染的跳蚤叮咬。因处理被感染动物或吸入感染性呼吸道飞沫而被感染是比较少见的。大多数人类鼠疫病例是零星的，多发生在农村地区。当流行病导致这些共栖鼠类大量死亡，从而迫使

表 41-1 耶尔森菌种的特征

耶尔森菌属	生化反应和鉴定特征[a] (biochemical reactivities and characteristics)																	与鼠疫耶尔森菌的 ANI %
	动力	鸟氨酸脱羧酶	尿素酶	VP	枸橼酸盐	吲哚	鼠李糖	蔗糖	纤维二糖	山梨糖	山梨醇	蜜二糖	棉子糖	七叶苷	L-阿拉伯糖	肌醇	D-木糖	
鼠疫耶尔森菌	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	+	100
假结核耶尔森菌	+	−	+	−	−	−	(+)	−	−	−	−	+	−	+	−	−	+	99.06
小肠结肠炎耶尔森菌	+	+	+	V	−	V	−	+	+	+	+	−	−	−	+	+	V	83.17
弗氏耶尔森菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	82.93
克氏耶尔森菌	+	+	+	−	−	+	−	−	+	+	+	−	−	−	+	(+)	+	82.88
鲁氏耶尔森菌	V	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	81.09
莫氏耶尔森菌	+	+	+	−	+	−	−	+	+	+	+	−	−	(+)	+	(+)	+	82.72[b]
伯氏耶尔森菌	+	+	+	−	−	−	−	+	+	−	+	−	−	−	+	−	+	82.77[b]
罗氏耶尔森菌	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+	+	+	−	+	−	+	82.65
阿尔德沃耶尔森菌	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	+	−	−	−	+	+	+	82.80
中间耶尔森菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	83.07
阿列克西奇耶尔森菌	+	+	+	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−	−	+	(+)	+	83.25
帕氏耶尔森菌	−	−	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	+	−	+	83.07[b]
类似耶尔森菌	+	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	+	+	−	+	94.52
食昆虫耶尔森菌	+	+	−	ND	+	−	−	+	+	−	−	+	+	−	−	−	−	81.03
马赛耶尔森菌	+	+	+	−	+	+	−	(+)	+	+	+	−	V	+	+	+	+	82.23[b]
纳氏耶尔森菌	+	+	−	+	+	−	−	+	(+)	−	−	−	−	−	−	−	−	80.84[b]
沃特斯耶尔森菌	−	−	+	−	−	−	+	ND	−	−	−	+	+	+	+	−	+	97.62[b]

注：[a] 25～28℃孵育。VP. Voges-Proskauer；V. 可变的；ND. 不可定；−. 阴性；+. 阳性；(+). 弱阳性；average nucleotide identity (ANI)：平均核苷酸一致性，提供了关于鼠疫耶尔森菌的平均核苷酸一致性。[b] 基于不完整基因组计算的 ANI

跳蚤寻找包括人类在内的其他宿主时,人类患病的风险最大。尽管有许多不同种类的蚤寄生在啮齿动物上,但鼠疫的传播与印鼠客蚤(*Xenopsylla cheopis*)有着经典的联系[5]。

2010—2015 年,16 个国家报道了 3248 例人类感染病例,其中死亡 584 例[22]。在这些病例中,96.1%来自非洲,3.3%来自美洲,0.5%来自亚洲[22]。在美国,1900—2015 年,共报道了 1036 例鼠疫病例。在最近几十年中,美国每年平均报道 7 例鼠疫病例(每年 1~17 例),其中 50%的病例发生在 12 ~ 45 岁的人群中(www.cdc.gov/plague)。本地获得的鼠疫病例仅发生在美国西部的农村和半农村地区,西经 100°上相邻的所有 17 个州的野生动物种群中都发现了鼠疫耶尔森菌。超过 80%鼠疫病例发生在新墨西哥州、亚利桑那州、科罗拉多州和加利福尼亚州[23]。

家犬和猫可作为鼠疫耶尔森菌感染跳蚤的携带者。在新墨西哥州,与对照组比较,鼠疫患者更喜欢让宠物睡在他们的床上[24]。猫也极易感染鼠疫,通过跳蚤叮咬或食入被感染的啮齿动物而被感染,可以发展为包括肺鼠疫在内的所有临床类型。受感染的猫通过抓伤、咬伤或气溶胶向人类直接传播病原菌,导致原发性肺鼠疫[23]。感染的狗通常不出现临床症状,但有些原发性肺鼠疫病例也可归因于与感染的狗有接触[25]。

尽管许多动物都容易受到鼠疫的感染,但在美国,有记录的病例大多还是与兔、松鼠、草原土拨鼠和宠物猫有关[23]。2016 年,有一例鼠疫病例是因被感染的草原土拨鼠咬伤而感染,这是草原土拨鼠在迁往野生动物保护区期间发生的[26]。狩猎野生动物也与人类感染有关,剥皮和处理猎物或摄入未煮熟的肉都有可能发生疾病的传播。

肺鼠疫可导致人与人之间的传播,构成了特殊的公共卫生威胁[27]。大多数传播都是因为家庭成员和医护人员通过密切接触吸入感染患者咳血痰时产生的气溶胶而发生。在美国,自 1924 年以来只发生了一个疑似的人传人病例[25]。在出现胸闷、呼吸困难和发热之前,该患者与原发性肺鼠疫患者有 5~6 天的密切接触。同时该患者在症状发作前 9~10 天也与受感染的狗有过接触,但是,较短的 5~6 天的潜伏期通常是原发性肺鼠疫的特征,故支持人与人之间传播的可能性[25]。对美国原发性肺鼠疫病例的分析表明,即使没有进行抗生素治疗或预防,大多数病例也不能传播给其他人[28],这与前抗生素时代仅采用常规措施就能快速、有效地控制疾病暴发的事实一致。然而,由于存在超级传播,持续暴发的可能性还是存在的。控制措施包括减少社交接触、隔离、检疫和简单的预防屏障[28]。

(二)肠致病性耶尔森菌

小肠结肠炎耶尔森菌是一种异质性的菌种,包含多种生物血清型,对人类和其他动物的致病性也存在差异[4]。小肠结肠炎耶尔森菌和人类疾病最相关的生物血清型是 1B/O:8,2/O:5、27,2/O:9,3/O:3 和 4/O:3,其中生物血清型 4/O:3 在美国和欧洲各国是最常见的类型[29-30]。生物型 1B 通常仅限于北美各国和日本,而 3 型主要在日本和中国[29]。温带和寒冷地带国家的发病率较高。主要通过粪口途径传播,通过摄入被感染动物粪便污染的食物或水而进入人体。在许多动物的胃肠道中都发现了该菌,最常见的是猪、鼠和狗。食物,特别是未经巴氏消毒的牛奶及生肉和未煮熟的肉中都可以携带这些菌种。

假结核耶尔森菌存在于环境(土壤和水)和各种野生动物中。这种细菌在气候寒冷的国家中广泛分布;在欧洲和亚洲的北部包括日本更为常见。在美国或欧洲,假结核耶尔森菌并不常见[30-31]。在法国,在过去的 50 年里,经培养确认的耶尔森病病例中只有 6%是假结核耶尔森菌[30]。与人类疾病相关的假结核耶尔森菌血清型包括在欧洲分离的 O:1 和 O:3 型,以及在日本分离的 O:4 和 O:5 型[29]。该菌的主要传染源是鼠、兔、鹿和野鸟。假结核耶尔森菌的传播方式是通过摄入被污染的食物(蔬菜和肉)或被感染动物污染的水或与被感染的动物接触。

大部分耶尔森病感染病例都是由小肠结肠炎耶尔森菌引起的。1996—2007 年,在美国,小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌感染的年平均发病率分别是每 100 万人中 3.5 例和 0.04 例[31]。近年来,耶尔森病的发病率一直在下降。美国(包括 9 个州的一项调查),调查 2005—2011 年间 721 例确诊的感染小肠结肠炎耶尔森菌或假结核耶尔森菌的病例,估计每年的发病率为 0.16/100 000。在美国,每年估计有 98 000 例感染耶尔森菌病,其中 533 例住院,29 例死亡[32]。

四、临床意义

鼠疫(plague)是一种严重的发热性疾病,若未经及时、适当地进行抗生素治疗则通常会致命。鼠疫有3种临床类型,即腺鼠疫、肺鼠疫和败血型鼠疫[1]。腺鼠疫是最常见的临床类型,占鼠疫病例的80%～90%,归因于被感染的跳蚤叮咬[23]。经过2～6天的潜伏期,突然出现发热、头痛、寒战和乏力,伴有一个或多个淋巴结肿胀,质地柔软伴疼痛(buboes)。肺鼠疫可以继发于腺鼠疫,也可以因直接吸入病原体气溶胶而引起原发性感染。潜伏期1～3天,症状包括发热、头痛、乏力和迅速进展的肺炎,并伴有呼吸急促、胸痛、咳嗽,有时还有血性或黏液水样痰[1]。肺鼠疫是该病最严重的临床类型,也是唯一可以在人与人之间传播的临床类型(通过感染性飞沫传播)。当微生物直接引入血流而不局限于淋巴结时,就会发生败血型鼠疫。患者会出现发热、畏寒、极度虚弱、腹痛、休克,甚至出现皮肤和其他器官出血。

未经治疗的肺鼠疫和败血型鼠疫的病死率接近100%,即使是经过治疗的病例病死率也往往超过50%。未经治疗的腺鼠疫的病死率在50%～60%[23]。1990—2010年,美国报告鼠疫耶尔森菌引起的感染总病死率为11%(www. cdc. gov/plague/faq/index. html)。因为正确诊断并报告给当地卫生局的病例相对较少,所以很难评估发展中国家的鼠疫感染病死率。WHO指出,2010—2015年,鼠疫感染的全球病死率为17.9%[22]。

小肠结肠炎耶尔森菌最常引起的疾病是因摄入被污染的食物或水而引起的胃肠炎。从包括牛肉、羊肉、猪肉和鸡肉在内的生肉中分离出小肠结肠炎耶尔森菌并不罕见。该菌还可污染熟食、预包装的熟食肉类和未经巴氏消毒的奶制品。分离自人类食物的菌株大部分都是非致病性血清型。猪常携带小肠结肠炎耶尔森菌致病性血清型,所以进食或处理生的或是未煮熟的猪肉类食物,特别是猪肠,是引起胃肠炎的主要危险因素[33-35]。也有报道,由于红细胞被污染,导致输血相关的小肠结肠炎耶尔森菌感染。由于该菌能够在冷藏温度下生存并繁殖,故少量无症状携带者捐献的血液可导致输血者感染[36,37]。

疾病的严重程度与细菌的血清型相关,疾病类型从自限性胃肠炎到易被误诊为阑尾炎的肠系膜淋巴结炎和与克罗恩病相似的末端回肠炎[38]。影像学可以帮助诊断阑尾炎,阑尾炎有右下腹痛的特征可帮助鉴别诊断[39]。幼儿最常见的是胃肠炎,在摄入受小肠结肠炎耶尔森菌污染的食物后出现发热、水样腹泻(偶有血便和重度腹泻)和腹痛。尽管临床症状通常在7天内消失,但患者的胃肠道中可携带该菌长达数月。细菌可经淋巴管从肠道转移至局部淋巴结。胃肠炎的罕见并发症是败血症。高危人群包括老年人和免疫功能低下的患者,尤其是和铁过载、恶性肿瘤、肝疾病和类固醇治疗等与代谢性相关的基础疾病患者。小肠结肠炎耶尔森菌感染导致的反应性关节炎是比较罕见的后遗症[40]。与小肠结肠炎耶尔森菌感染相关的其他较不常见的后遗症包括结节性红斑和化脓性关节炎[41]。

假结核耶尔森菌通常引起自限性疾病。感染虽然很少见,但最常见于儿童和年轻人。假结核耶尔森菌感染引起的临床症状包括腹痛和发热。腹痛常位于右下腹,引起的肠系膜淋巴结炎与阑尾炎相似[39]。腹泻很少见。假结核耶尔森菌还可以引起末端回肠炎,与克罗恩病相似[42-43]。败血症通常发生在免疫功能低下的患者中,铁过载(如肝硬化或血色素沉积症)患者有发生败血症的风险[44]。据报道,假结核耶尔森菌感染的后遗症包括反应性关节炎和结节性红斑[45-46]。在日本和俄罗斯,具有超抗原毒素YPMa的假结核耶尔森菌是远东猩红热的病原体,这是一种严重的全身炎性疾病[47]。

因缺乏经典的毒力标志物(70 kb毒性质粒),其他耶尔森菌物种(表41-1)一般归类为非致病性细菌。从粪便标本分离出了包括中间耶尔森菌、弗氏耶尔森菌、莫氏耶尔森菌和克氏耶尔森菌等在内的几种菌种。在一项针对法国50年间从人类、动物、环境(水,污水)和食物来源中分离出的大约20 000株耶尔森菌的研究中发现,与致病性耶尔森菌相比,从食物和环境中更易分离出非致病性耶尔森菌,它们通常是来源于动物。鉴于自然界中非致病性耶尔森菌种类丰富,推测它们经常进入人类肠道[30]。

五、标本的采集、运输和储存

临床实验室需要关注美国微生物学会发布

的警戒级(sentinel-level)临床微生物学实验室指南(www. asm. org/index. php/guidelines/sentinel-guidelines)。在美国,鼠疫耶尔森菌被分类为第1类致病菌(Tier 1 Select Agent)(第15章)。在欧盟各国和俄罗斯,鼠疫耶尔森菌分别被归为极高威胁组和第1类[48]。要接收或保存鼠疫耶尔森菌菌株的实验室,必须在联邦管控制剂项目(https://www. selectagents. gov)上登记注册。临床实验室如果只是对培养出的病原体进行鉴定试验则可以免除登记注册。只要他们能在鉴定后的7天内销毁或转运所有已经确认的病原菌。

所有怀疑含有鼠疫耶尔森菌样品的处理都应在至少生物安全二级水平(BSL-2)的实验室中进行。建议在涉及处理潜在感染性材料的所有实验活动中,要使用BSL-2的操作程序、防护设备和设施(www. cdc. gov/biosafety/publications/bmbl5/;请参阅本书第15章)。所有可能产生气溶胶的实验(包括培养物的处理)应在BSL-3条件下或BSL-2条件下采取BSL-3防护措施的情况下进行。鼠疫耶尔森菌已确定可引起实验室生物危害。在美国已有实验室获得性鼠疫病例的报道,其中几例是致命的,并且都发生在研究所和临床实验室中[23,28,49]。

缺乏*pgm*基因位点(一个编码耶尔森菌铁转运体、Hms生物膜和其他系统的102 kb大小的染色体区域)或60~85 kb毒力质粒(编码TTSS及其效应因子Yop蛋白)的鼠疫耶尔森菌不在美国管控制剂项目目录中(www. selectagents. gov)。但是,需要注意的是,*pgm*基因突变的鼠疫耶尔森菌仍然能够致病。2009年报道了一例由减毒的*pgm*鼠疫耶尔森菌引起的实验室获得性感染死亡病例,该研究员患有因隐匿性铁过载而未确诊的血色素沉积症[49]。缺乏毒力质粒的鼠疫耶尔森菌菌株被认为是无致病性的[50]。

对于鼠疫耶尔森菌,首选实验室检测标本取决于临床表现。表现为淋巴结炎的推荐采集血液和淋巴结穿刺液,败血症建议采集血液,肺炎建议采集呼吸道样本(如痰)和血液。由于腺鼠疫患者的细菌会间歇性从组织释放到血液中,特别是在疾病的初期,因此疾病的早期血培养的敏感性可能会受到限制。从尸检样本、淋巴结、脾、肝和肺得到的组织样本可用于检测。对于有临床症状患者的间接检测,血清样品可以用于鼠疫耶尔森菌抗体的检测。应在感染早期收集第一份血液样本,然后在恢复期(间隔至少14天,最好在出现症状后3~4周)收集第2份血液样本。

Cary-Blair培养基和棉拭子能保存活菌,可用作运送。已得到证实鼠疫耶尔森菌在Amies培养基中室温条件下可存活96 h[51]。ESwabs尚未经过专门测试是否可用于鼠疫耶尔森菌,但由于它们基于Amies培养基,故可能适合作为运输培养基。为了最大限度地降低活菌损失,标本应立即送到实验室,如果预计运输会超过2 h,则应在2~8℃下运输标本。不建议将标本冷冻,因为冻融会导致活细菌裂解,除非是在一个有保护的环境中,如组织标本或含甘油的溶液中。血清应尽快分离,最好在24 h之内进行。血清在2~8℃下最多保存14天。如果检测需延迟更长时间,则血清样品需冷冻。

根据怀疑感染类型的不同,用于小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌培养的标本可以是粪便、血液或淋巴结。如果怀疑是食源性暴发,则应由当地卫生部门处理此类标本。将食物在4℃保存下尽快运送。棉拭子需要放在Cary-Blair、Amies或Stuart培养基中4℃运送到实验室。粪便标本也可以放置运送培养基,如预计运送时间超过2~4 h,则应维持温度在4℃。

六、直接检查

(一)显微镜检查

耶尔森菌为革兰阴性小杆菌(直径0.5 μm,1~2 μm长),单个排列(琼脂平板涂片),或成对或短链状排列(液体培养基涂片)。在外周血或组织用瑞氏、吉姆萨或Wayson染色后可显示鼠疫耶尔森菌两极浓染的特性(图41-1a)(https://www. asm. org/index. php/guidelines/sentinel-guidelines);但是两极浓染并不是耶尔森菌种所特有,而且也不总是很明显。革兰染色通常不会观察到鼠疫耶尔森菌的两极浓染。临床标本的非特异性染色诊断价值有限。

(二)抗原检测

一种快速、特异的染色方法,即直接荧光抗体(DFA),可用于检测标本中的鼠疫耶尔森菌,包括使用针对荚膜F1抗原的荧光素标记抗体[52]。

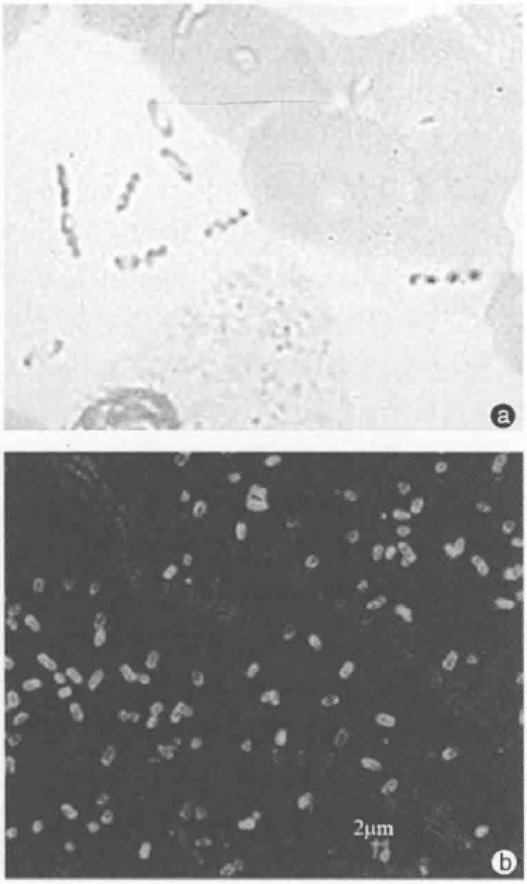


图 41-1 a. 一位鼠疫耶尔森菌感染患者的血涂片，吉姆萨染色，注意双极浓染的封闭式安全回形针样细菌；b. 生长在37℃绵羊血琼脂平板的鼠疫耶尔森菌直接荧光抗体(F1结合物)染色，见彩插

培养物、病变组织(淋巴结、肝、脾和肺)或抽吸物都可通过这种方法进行快速检测(图 41-1b)。由于F1抗原仅在高于33℃的条件下表达，故无法对环境样品(跳蚤等)或维持在低于33℃培养环境中的细菌进行染色。在美国，标本的DFA检测应由LRN(Laboratory Response Network)的参考实验室进行。固定在福尔马林中的组织活检标本也可利用针对鼠疫耶尔森菌F1荚膜抗原的单克隆抗体进行免疫组化染色[53]。参考方法由疾病预防控制中心提供。

基于F1抗原捕获的免疫层析测定法，Smart Ⅱ鼠疫耶尔森菌(F1)试纸(New Horizons Diagnostics)、鼠疫生物威胁警报试纸(Plague BioThreat Alert test strips, Tetracore)和BADD Plague试纸(ADVNT Technologies)在美国已经商品化。然而，这些试纸仅用在检测环境样品中的鼠疫耶尔森菌，而不用于鼠疫的临床诊断或鼠疫耶尔森菌分离株的鉴定。一种已经开发出用于肠道致病性耶尔森菌的免疫层析测定法，在对人工污染的粪便标本进行检测的初步评估表明，它比培养法的敏感性更高[54]。

(三)核酸检测

核酸扩增试验(NAAT或PCR测定)已被用于检测患者样品中的DNA。对于鼠疫耶尔森菌，大多数实时NAAT测定都针对纤溶酶原激活基因(*pla*)或编码F1抗原的*caf*1基因；2个基因均位于高拷贝的鼠疫耶尔森菌特异性质粒上。值得注意的是，大鼠和一些肠杆菌科细菌中的*pla*基因与鼠疫耶尔森菌具有高度同源性(相似度98.8%)，故不建议将单独针对*pla*基因的NAAT测定用于鼠疫耶尔森菌感染的检测，因为有假阳性的可能性[55-57]。迄今为止，人类临床标本中使用NAAT测定鼠疫耶尔森菌还是有限的。提取47位经培养确认患者的腹股沟抽取液，经用针对*caf*1和*pla*基因的实时PCR检测，证明了培养与PCR之间有100%的相关性[58]。LRN参考实验室可用实时NAAT诊断鼠疫。在最近的出版物已经描述了这些检测法用于鼠疫(肺鼠疫和腺鼠疫)诊断的实用性[25,59]。目前开发出一种用于识别26种不同的呼吸道病原体TaqMan阵列卡，包括鼠疫耶尔森菌，但尚未对鼠疫患者的临床标本进行评估[60]。这种类型的方法在病原体尚不清楚的疑似肺炎暴发情况下可能具有特殊价值。美国FDA最近批准了一种基于NAAT的两靶标系统，用于检测生物恐怖样品，包括鼠疫耶尔森菌(www.biofiredefense.com/jbaids/)。但是，该系统不能用于商业。一种用于鉴定鼠疫耶尔森菌和假结核耶尔森菌的多重实时NAAT，是基于鼠疫耶尔森菌染色体基因*ypo*2088、质粒上的*pla*基因和鼠疫耶尔森菌和假结核耶尔森菌共有的wzz基因[61]。

NAAT已被作为敏感方法用于检测食品的少量小肠结肠炎耶尔森菌[62]，也用于检测储存的红细胞以防止输血感染[63]。使用可检测多达5种不同的毒力基因的多重NAAT可以区分食品和分离株中的致病性和非致病性血清型，并特异性鉴定小肠结肠炎耶尔森菌O：3血清型[62,64]。NAAT还被用于区分假结核耶尔森菌和小肠结肠炎耶尔森菌，并包括O基因和毒力分型[62,64]。

非培养的诊断测试越来越多地用于诊断肠道

疾病，并且有很多平台可用。一种基于商业化的多重检测方法，xTAG 胃肠道病原体测试板(xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel)(Luminex Corporation)，可直接从粪便中检测出最常见的胃肠道病原菌，包括小肠结肠炎耶尔森菌[65]。针对该方法用于检测临床样品中的小肠结肠炎耶尔森菌的评估发现，有 2 个标本用常规方法造成了漏检；而另一项研究发现，有 2 个小肠结肠炎耶尔森菌 NAAT 阳性标本漏检了[66,67]。BioFire FilmArray GI 也包括针对小肠结肠炎耶尔森菌的 NAAT 检测。一项多中心的前瞻性研究仅检测到一个阳性样本[68]。使用 24 份阳性和 242 份阴性粪便样本对 xTAG 胃肠道病原体测试板和 BioFire FilmArray GI 测试条进行比较，发现对小肠结肠炎耶尔森菌的敏感性和特异性分别为 48.1%、100%及 100%、99.6%[69]。

由于耶尔森菌病比较少见，无法通过前瞻性研究对非培养的检测平台进行有效的评估，而回顾性[66]或加菌(人工)粪便标本[70]并未包括小肠结肠炎耶尔森菌以外的菌种。使用加菌的粪便标本评估 BioFire FilmArray 胃肠道测试条的性能，这些加菌的粪便标本培养都是阴性。加入粪便标本中的耶尔森菌包括 9 种耶尔森菌菌属的 16 株菌。掺入小肠结肠炎耶尔森菌的 3 个样品都为阳性。但是掺入弗氏耶尔森菌的 3 个样品和掺入克氏耶尔森菌的 2 个样品中的 1 个小肠结肠炎耶尔森菌检测为阳性，表明该测定法与其他耶尔森菌属有交叉反应(美国 CDC，未发表的数据)。

七、分离程序

培养结果可以对感染做出最终诊断，对于公共卫生监测系统具有重要的价值。25～35℃空气环境下培养 24～48 h，耶尔森菌可在临床实验室中大多数常规培养基上生长，包括血液、巧克力和麦康凯琼脂。假结核耶尔森菌和小肠结肠炎耶尔森菌推荐在 25℃下分离培养，因为在较高温度下毒力质粒不稳定。

由于耶尔森菌比大多数肠杆菌科细菌生长要慢，因此应使用选择性培养基从非无菌部位来源标本(如粪便、痰)和环境样品中分离培养耶尔森菌。伊红亚甲蓝，木糖-赖氨酸-脱氧胆酸琼脂和 Hektoen 肠道选择性琼脂在分离小肠炎耶尔森菌方面没有任何优势，也不能将肠道致病性耶尔森菌与粪便正常菌群区分开来。培养小肠结肠炎耶尔森菌的选择性培养基包括头孢磺啶-氯苯酚-新生霉素(CIN)琼脂，它可以抑制许多其他肠杆菌科细菌，耶尔森菌显色培养基(CHROMagar Yersinia)和沙门菌-志贺菌脱氧胆酸盐氯化钙琼脂(salmonella-shigella deoxycholate calcium chloride agar)[71-72]。在室温下，CIN 琼脂对耶尔森菌分离率高于麦康凯琼脂和 SS 琼脂，耶尔森菌显色培养基分离小肠结肠炎耶尔森菌的敏感性与 CIN 琼脂一致，可用于从粪便中直接分离病原菌[72]。许多假结核耶尔森菌在 CIN 琼脂和耶尔森菌显色培养基上生长受抑制，因此优选麦康凯琼脂进行分离培养。

从食物中分离小肠结肠炎耶尔森菌比临床标本更为困难，通常将样品送至公共卫生实验室。食物必须用生理盐水[或选择性肉汤，如改良 Rappaport 肉汤(MRB)，其中含有氯化镁、孔雀绿和羧苄西林]在低温下增菌约 21 天(MRB 肉汤 2～4 天)[73]。

在绵羊血琼脂平板上，25℃培养 24～72 h，可分离出小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌单个菌落，菌落大小分别为 0.5～1.0 mm 和 3～4 mm(图 41-2a，b)。小肠结肠炎耶尔森菌菌落在 CIN 琼脂上中心呈红色，似公牛眼状，其他肠杆菌科细菌在 CIN 琼脂上也可以生长，如沙雷菌、摩根菌、枸橼酸杆菌等，其菌落和小肠结肠炎耶尔森菌类似，但更大。

无菌部位来源的标本可以在绵羊血琼脂平板上分离出鼠疫耶尔森菌。尽管鼠疫耶尔森菌在 28℃时生长较快，但这可能不容易观察到，在琼脂平板上，鼠疫耶尔森菌的菌落大小通常与 37℃一样大。从污染的标本或非无菌部位来源(包括痰样本)标本中分离鼠疫耶尔森菌，建议使用 CIN 琼脂(图 41-3)。接种的平板应在 25～28℃下孵育。鼠疫耶尔森菌也可在血培养瓶中生长，故可将血液直接注入需氧血培养瓶中，并在 35～37℃孵育条件下连续监测，血培养阳性标本转种到血琼脂平板上。尽管鼠疫患者的数据非常有限，但据报道商业血液培养系统 1～2 天就可报阳[25,74]。如果怀疑鼠疫，应将血培养瓶培养至 7 天，以便鼠疫耶尔森菌生长。

在绵羊血琼脂平板上孵育 48 h 后，鼠疫耶尔森菌菌落的直径为 1.0～1.5 mm，边缘不规则，灰白色至不透明，孵育 72 h 后，其大小为 3～4 mm(图

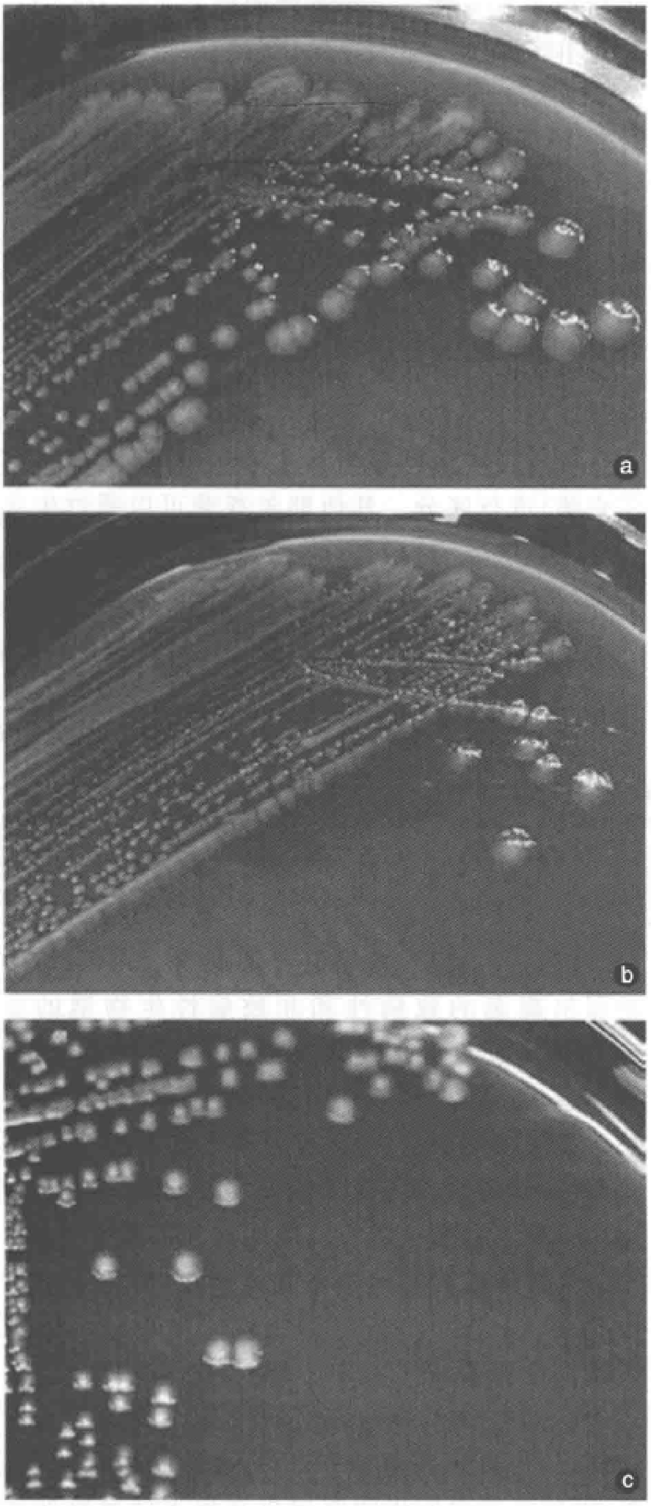


图 41-2 小肠结肠炎耶尔森菌(a)和假结核耶尔森菌(b)在绵羊血琼脂平板上,25℃培养 72 h;鼠疫耶尔森菌在绵羊血琼脂平板上,28℃培养 72 h(c),见彩插

41-2c)。在血琼脂上不溶血。48~72 h 后菌落呈煎蛋样,中心不透明(图 41-2c)。鼠疫耶尔森菌在麦康凯琼脂上生长较慢,培养 48 h 后,菌落呈无色(不发酵乳糖)针尖大小。在 CIN 琼脂上,鼠疫耶尔森菌菌落中心呈红色,生长也比在 SBA 上要慢。

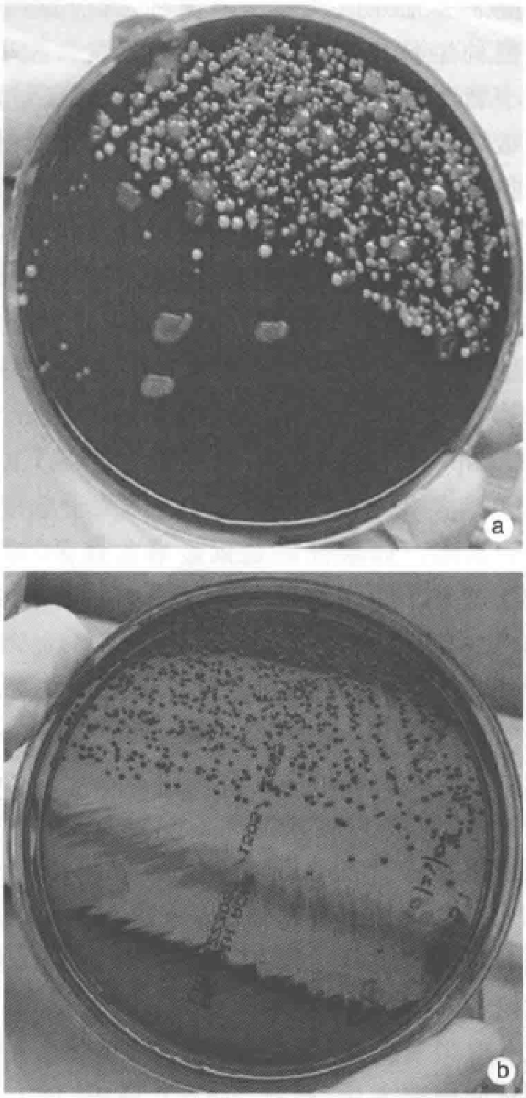


图 41-3 将污染的腹股沟抽吸物接种在(a)SBA 和(b)CIN 琼脂上。请注意,CIN 琼脂上仅鼠疫耶尔森菌的菌落生长,而 SBA 琼脂上有多种类型的菌落生长,见彩插

八、鉴定

耶尔森菌触酶阳性,氧化酶阴性,发酵葡萄糖。小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌可通过三糖铁(TSI)和赖氨酸铁琼脂斜面推测性鉴别。小肠结肠炎耶尔森菌 TSI 底部和斜面都变黄,不产气,而假结核耶尔森菌类似志贺菌属,斜面碱性(红色)底部酸性(黄色)。两者赖氨酸脱羧酶都为阴性,故在赖氨酸铁琼脂斜面中都是底部变黄。一些自动生化鉴定系统的数据库有耶尔森菌,包括鼠疫耶尔森菌,但是大部分数据库只是根据少量耶尔森菌菌株的测试结果而建立的。自动化系

统可能无法充分识别耶尔森菌种,部分原因可能是该菌种生长缓慢,生化反应不活泼。API 20E 鉴定小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌特异性和敏感性最高[75]。

临床实验室中疑似鼠疫耶尔森菌的鉴定基于以下几方面:革兰阴性小杆菌(直径 0.5 μm,1~2 μm 长),触酶阳性,氧化酶及脲酶阴性;培养 48 h 后血琼脂上为 1.0~1.5 mm 灰白色不规则菌落,在麦康凯琼脂上为不发酵乳糖的针尖状菌落。参阅美国微生物学会网站(https://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines)上的警戒水平的临床微生物实验室指南中关于鼠疫耶尔森菌的指南。如果怀疑是鼠疫耶尔森菌,应立即将样品送至参考实验室确认(或排除)。在美国,所有州都有至少一个 LRN 参考实验室,可以鉴定选择级(select agents)的细菌,包括鼠疫耶尔森菌。另请参阅 www.emergency.cdc.gov/lrn。世界卫生组织鼠疫耶尔森菌合作中心也可以提供指导和诊断测试。快速诊断和治疗对于降低鼠疫耶尔森菌感染相关的病死率至关重要。16S rRNA 测序可以提供属水平的鉴定,分离菌用该方法鉴定为耶尔森菌菌属,如果怀疑是鼠疫耶尔森菌,应转运给 LRN 参考实验室。

在参考实验室可通过特异的噬菌体裂解及分子和抗原检测方法,包括 NAAT 分析(PCR 和测序)和直接荧光抗体检测(DFA)(图 41-1b)鉴定鼠疫耶尔森菌。在美国,噬菌体裂解实验是鉴定鼠疫耶尔森菌的确证方法,在 LRN 参考实验室都有试剂和测定方法。16S rRNA 测序方法不能区分鼠疫耶尔森菌和假结核耶尔森菌,不能单独用于鼠疫耶尔森菌的鉴定。

由于鼠疫耶尔森菌生长缓慢,同时很多鉴定系统关于该菌的数据有限,自动生化鉴定系统对鉴定鼠疫耶尔森菌会造成误判。使用 MicroScan 可将鼠疫耶尔森菌人类分离株误鉴定成洛菲不动杆菌,使用 VITEK 2 会误鉴定成浅黄假单胞菌(*Pseudomonas luteola*)和假结核耶尔森菌,使用 Phoenix 误鉴定成假结核耶尔森菌[25,59,74]。由于有这些局限,临床微生物学家必须高度慎重。自动生化鉴定系统的鉴定结果临床实验室要慎重分析,并考虑到这些系统对准确识别慢生长或少见菌株的可靠性[25,74]。错误鉴定的可能标志包括低概率或可信度,以及病原菌的鉴定与临床或微生物特征不一致。

小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌与鼠疫耶尔森菌很好区分,前两者脲酶 25℃强阳性,37℃阳性,动力 25℃阳性,而鼠疫耶尔森菌都是阴性(表 41-1)。因为处理鼠疫耶尔森菌有气溶胶暴露的风险,所以不推荐用玻片做动力试验,应采用半固体琼脂。小肠结肠炎耶尔森菌通常枸橼酸盐阴性,吡嗪酰胺酶阴性(除 1A 菌株),不发酵黏酸盐(mucate)和鼠李糖,发酵蔗糖,可以和其他耶尔森菌区别(表 41-1)。而假结核耶尔森菌则可以通过鸟氨酸脱羧酶阴性与其他耶尔森菌(非鼠疫耶尔森菌)进行区分。其他耶尔森菌可以通过生化反应进行鉴定(表 41-1)[76]。

一种新型的商业系统,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)(MALDI Biotyper System,Bruker 和 VITEK-MS,bioMérieux),显示了鉴定耶尔森菌的潜力[77-80]。MALDI-TOF MS 因为鉴定速度快且成本低(每个鉴定低于 1 美元)而非常有优势。相较其他鉴定系统,它们存在一个限制,需要用典型的参考菌株来建立数据库以避免错误鉴定。通过进行菌种和生物型的鉴定已证明 MALDI-TOF MS 能用于小肠结肠炎耶尔森菌的致病性和非致病性生物型的鉴定[81]。最近的研究表明,在美国 FDA 批准的用于商业 MALDI-TOF MS 系统的 IVD 数据库中缺乏鼠疫耶尔森菌,导致无法区分鼠疫耶尔森菌和假结核耶尔森菌,会将鼠疫耶尔森菌误鉴定为假结核耶尔森菌[77,79,80]。使用科研型数据库时,也会有类似的情况。也有文献报道,临床实验室用 MALDI-TOF MS 将假结核耶尔森菌误鉴定成鼠疫耶尔森菌[82]。在 MALDI-TOF MS 靶标制备过程中也必须考虑生物安全。最近的出版物发现,与直接菌落或平板甲酸提取法相比,乙醇/甲酸试管提取法能够更可靠地灭活鼠疫耶尔森菌[80]。

为了在临床实验室中使用 MALDI TOF MS 对耶尔森菌菌种进行高可信度鉴定,需要开发和评估更强大的商业数据库。迄今为止,尚缺乏除小肠结肠炎耶尔森菌、假结核耶尔森菌和鼠疫耶尔森菌以外的其他耶尔森菌菌种的数据。由于在商品化数据库中缺乏鼠疫耶尔森菌数据,而科研数据库对假结核耶尔森菌和鼠疫耶尔森菌的区分较差,故应通过其他实验室测试来验证 MALDI

TOF MS对耶尔森菌的鉴定。正如其他自动识别系统所提到的那样，实验室人员应考虑所用数据库的局限性、与分离株相关的临床和微生物特征及与识别相关的置信度值。

九、分型系统

分离株被鉴定为耶尔森菌属后，生化、血清学和分子分型的方法可用于进一步的鉴定，而且对于不同菌株的发病机制和地域分布的流行病学调查很有价值。小肠结肠炎耶尔森菌有6种生物群，即1A、1B、2、3、4和5群，可以通过七叶苷、吲哚、D-木糖、海藻糖、吡嗪酰胺酶、β-D-葡糖苷酶和脂酶等生化反应来区分(表41-2)。尽管从人类粪便标本中分离到生物群1A，但该生物群通常被认为是非致病性的，因为其缺乏在其他耶尔森菌菌株中存在的毒力质粒pYV和主要的染色体毒力基因。然而，该生物型与食源性暴发有关，其他证据包括肠毒素的产生、在巨噬细胞内存活及对上皮细胞的侵袭表明它能够引起人类疾病[83]。生物群1B和2～5被认为是有致病性的。可通过水杨苷和吡嗪酰胺酶阳性将生物群1A与其他菌株区分开(表41-2)[84]。血清分型也有助于确定分离株的致病性，已知的70多种血清型中只有一小部分是致病的。只有两种抗血清容易获得，需要对致病性小肠结肠炎耶尔森菌进行血清分型时可在美国CDC(亚特兰大，佐治亚州)进行。其他已被确认的评估小肠结肠炎耶尔森菌致病性的方法都是基于毒力质粒的存在，包括自身凝集反应、37℃钙依赖性生长和刚果红色素沉着试验。刚果红选择性培养基和PCR可用于区分毒力菌株和非毒力菌株，但目前这种方法只用于实验研究[63]。

表41-2 小肠结肠炎耶尔森菌[a]生物型生化反应(25℃孵育48h)

试验	生物型生化反应[b]					
	1A	1B	2	3	4	5
脂肪酶	+	+	−	−	−	−
七叶苷	+	−	−	−	−	−
水杨苷	+	−	−	−	−	−
吲哚	+	+	(+)	−	−	−
木糖	+	+	+	+	−	d
海藻糖	+	+	+	+	+	−
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	−
DNA酶	−	−	−	−	+	+
吡嗪酰胺酶[c]	+	−	−	−	−	−

注：[a]得到来自出版商S. KargerAG，巴塞尔，瑞士的参考文献[102]允许而修改。[b]+. ≥90%菌株阳性；d. 11%～89%菌株阳性；−. ≥90%菌株阴性；(+). 弱阳性。[c]根据Kandolo和Wauters文章[103]

包括脉冲场凝胶电泳(PFGE)和多位点可变数目串联重复序列分析(MLVA)在内的分子分型方法已经应用于区分耶尔森菌属内的单个菌株。脉冲场凝胶电泳比核糖体分型法对小肠结肠炎耶尔森菌的病原体分型更有用[62]。随着全基因组测序在公共卫生实验室中变得越来越普遍，已经有了使用菌株全基因组序列进行菌株分型的方法。全基因组多位点序列分型方法可用于鼠疫耶尔森菌分离株的分型，使用分类明确的菌株证实该方法能够准确地区分流行病学相关和未相关的分离株[85]。病例分析进一步证明了这种全基因组多位点序列分型方法能确定人类来源与环境来源(动物，跳蚤)分离株之间的关联并确定传染源，同时也证明了流行期间的鼠疫耶尔森菌的多样性[26,85-86]。这种方法比脉冲场凝胶电泳有更高的分辨率，因为它比较了鼠疫耶尔森菌每个基因序列的差异[85]。已有学者提出将小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌全基因组序列分型作为暴发监测的有效工具，但尚未公布标准化方法[87-88]。

十、血清学试验

当培养阴性时，或用于鼠疫疫区的回顾性诊

断或流行病学研究，血清学可以在鼠疫的诊断中发挥作用。由于鼠疫的潜伏期短而未经治疗的患者病死率高，血清学试验在临床诊治中的价值有限。大多数感染鼠疫耶尔森菌的患者在症状发作后1～2周能检测到血清抗体。鼠疫耶尔森菌血清学试验中最常用的抗原是荚膜F1抗原，它对鼠疫耶尔森菌具有特异性和高免疫原性，并在哺乳动物感染期间大量产生。有研究显示，鼠疫既往感染者体内F1抗体持续存在。5年和10年的阳性率分别为88.0%、69.5%[89]。血清学方法包括间接血凝试验，可用于测试人和动物样本。患者恢复期血清F1抗体滴度比急性期升高4倍可确诊鼠疫。

血清学方法可用于辅助诊断小肠结肠炎耶尔森菌或假结核耶尔森菌引起的感染。在发病的第1周内可检测到抗体，3～6个月后恢复到正常水平。血清学试验的特异性在82%～95%，这是因为2个菌种之间，以及和布鲁菌、弧菌、伯氏疏螺旋体、肺炎衣原体、部分大肠埃希菌血清型间存在交叉反应。用血清学进行诊断的另一个缺点是，因经常暴露于非致病性血清型菌株，健康人群血清中也常存在小肠结肠炎耶尔森菌抗O抗原抗体。

仅存在于小肠结肠炎耶尔森菌毒力株中的外膜蛋白(Yops)抗体可能对诊断更有帮助。在小规模的针对健康献血员的研究表明，Yops IgM抗体诊断急性感染的特异性是97%[90]。有报道在新西兰小肠结肠炎耶尔森菌胃肠炎发病率很高，在新西兰的献血者中进行Yops IgA抗体检测，结果显示其对预防输血相关感染非常有帮助[91]。用Western免疫印迹法检测Yops IgM、IgA和IgG特异性抗体水平与临床表现和后遗症相关[92]。

十一、抗菌药物敏感性

FDA批准链霉素、四环素、环丙沙星和左氧氟沙星用于鼠疫的治疗。尽管庆大霉素未经FDA批准用于鼠疫治疗，但根据临床经验，庆大霉素被认为是链霉素的可接受替代品。治疗指南参见美国CDC网站(www.cdc.gov/plague/healthcare/clinicians.html)。出于生物安全的考虑，以及用于治疗鼠疫的抗菌药物极少有耐药菌株的报道，临床微生物实验室无须开展鼠疫耶尔森菌的药敏试验。临床和实验室标准化协会(www.clsi.org)已公布鼠疫耶尔森菌MH肉汤微量稀释法药敏解释标准和质控规则[93]。为了将微量肉汤稀释法结果的报告时间从24～48 h缩短到6 h，已经对激光散射技术进行评估，用于实时测定含抗生素肉汤中细菌的增生来确定鼠疫耶尔森菌抗生素敏感性[94]。

美国没有报道过鼠疫耶尔森菌耐药菌株，其他地方也非常少[95]。测定了来自17个国家392株鼠疫耶尔森菌分离株(其中214株于1971－2009年分离自美国)对8种用于预防或治疗的抗菌药物(庆大霉素、链霉素、四环素、多西环素、环丙沙星、左氧氟沙星、氯霉素和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑)的敏感性，未发现有耐药株[95]。还没有因鼠疫耶尔森菌耐药而导致治疗失败的报道。对10株分离自鼠疫死亡病例的鼠疫耶尔森菌进行了测定，患者曾接受过庆大霉素、四环素、氯霉素、多西环素或链霉素的治疗，但并没有发现对这些药物耐药的菌株[95]。马达加斯加和蒙古(1995－2000年)报道了极少量的由质粒介导对一线治疗药物耐药的鼠疫耶尔森菌分离株[96,97]。在过去的20年中，对马达加斯加患者分离株的常规药敏试验未能发现任何进一步的多重耐药证据[95,97,98]。这些监测数据与鼠疫耶尔森菌缺乏在自然周期中获得和维持多重耐药质粒的特性相一致。

大多数小肠结肠炎耶尔森菌胃肠炎病例不需要治疗；但是全身性疾病，尤其是对于免疫抑制患者治疗是必须的。治疗方案包括甲氧苄啶-磺胺甲噁唑和一种氟喹诺酮类药物。小肠结肠炎耶尔森菌产生两种不同的β-内酰胺酶，一个是A类酶，另一个是不被β-内酰胺酶抑制剂抑制的可诱导C类酶。存在1种或2种β-内酰胺酶取决于生物群类型[99]。尽管β-内酰胺酶使小肠结肠炎耶尔森菌对青霉素产生耐药性，但该菌对超广谱头孢菌素均敏感。对氟喹诺酮类的耐药归因于*gyrA*基因突变或外排泵。西班牙进行的一项研究，分离自胃肠炎患者的小肠结肠炎耶尔森菌对萘啶酸耐药率为23%，所有耐药菌株都存在*gyrA*基因的突变，部分菌株还存在外排泵[100]。小肠结肠炎耶尔森菌体外药敏试验对氨基糖苷类、氯霉素、四环素、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑和超广谱头孢菌素敏感。假结核耶尔森菌对氨苄西林、四环素、氯霉素、头孢菌素类和氨基糖苷类药物敏感。尽管假结核耶尔

森菌引起的自限性感染通常不需要治疗，但败血症患者需用氨苄西林、链霉素或四环素治疗。

十二、结果的评价、解释和报告

分离到革兰阴性小杆菌（直径 0.5 μm，1～2 μm 长），血琼脂平板上 28℃ 和 37℃ 都生长缓慢（24 h 后为灰白色针状菌落），麦康凯琼脂上不发酵乳糖（48 h 后为针状菌落），氧化酶阴性、触酶阳性、脲酶阴性的菌株应高度怀疑为鼠疫耶尔森菌，应立即转送至 LRN 参考实验室。原始标本 F1 抗原、DFA、IHC 染色或 NAAT 检测阳性只能疑诊为鼠疫耶尔森菌。单次的血清阳性结果只能疑诊鼠疫。确诊鼠疫耶尔森菌感染包括培养物鉴定为鼠疫耶尔森菌或鼠疫耶尔森菌 F1 抗体血清滴度恢复期较急性期升高 4 倍。从人体任何标本中分离的鼠疫耶尔森菌都有临床意义，而且需要进一步的调查。最有可能分离到鼠疫耶尔森菌的是痰、腹股沟淋巴结穿刺物和血液标本。由于缺乏准确鉴定鼠疫耶尔森菌的商用系统，且鼠疫耶尔森菌可成为潜在的生物武器，并引起严重感染，所以所有疑似鼠疫耶尔森菌分离株都需要送到当地公共卫生实验室来确认。MALDI TOF MS 鉴定出的耶尔森菌属应通过其他实验方法来验证。

在美国，鼠疫是国家法定报告传染病，鼠疫耶尔森菌也被列为 1 级致病菌。实验室鉴定出鼠疫耶尔森菌需在 24 h 内上报至管控制剂项目，并在 7 个工作日内提交表格 4。报告表格、联系方式、实验室注册信息及《美国联邦法典》的相关引文可在 https://www.selectagents.gov 上查找。

从粪便中分离出的非鼠疫耶尔森菌还不足以作为引起感染的证据，因为非致病性菌株可能是粪便的正常菌群。从有症状但排除其他诊断的患者分离到的纯培养，则应被认为是可疑的致病菌。任何分离自血液或其他无菌部位的菌株都是有意义的。肠道致病性耶尔森菌不是国家法定报告菌种，所以其发病率可能被低估。疾病预防控制中心通过食源性疾病主动监测网络（FoodNet）（https://www.cdc.gov/foodnet/index.html）监控耶尔森菌感染病例的发生率。

对所有粪便标本用 CIN 琼脂筛选小肠结肠炎耶尔森菌并不划算[101]。各地的分离率有很大的差异，温带地区发病率最高，因此每个实验室都应和感染科医生协商并进行评估后才决定是否需要在粪便标本中常规筛选该菌。

由于耶尔森菌属比较少见，对它的鉴定非常具有挑战性，特别是对于鼠疫耶尔森菌和假结核耶尔森菌。如果临床实验室培养或鉴定到耶尔森菌，则建议咨询参考实验室。

参考文献请扫二维码查阅

第 42 章　气单胞菌属*

BRIGITTE LAMY，AMY J. HORNEMAN

（曾吉　译；杨青、徐春晖　审校）

一、分类学

气单胞菌属（*Aeromonas*）属于气单胞菌科（Aeromonadaceae）[1]和建议的气单胞菌目（Aeromonadales，order. nov.），该科还包括海洋单胞菌属（*Oceanimonas*）和甲苯单胞菌属（*Tolumonas*）[2]。这些菌属中只有气单胞菌属对人类有致病性。气单胞菌属频繁地重新分类和不断地修正或扩展描述一直困扰着许多微生物学家。但大多数争议已得到解决[3]，且最近的进展有助于对气单胞菌属的阐明，尽管更为复杂。现在的数据清楚地表明，气单胞菌属由一些菌种复合群组成，即一群界限不清的菌种，弧菌、不动杆菌和肠杆菌科部分菌属也有类似情况[4]。自从 2006 年对第 1 株气单胞菌进行测序和注释（模式菌株嗜水气单胞菌嗜水亚种 ATCC 7966）[5]，大多数模式菌株和许多野生菌株（field strains）也进行了测序，为更准确的分类提供了宝贵的数据[3]。

在本属的 36 个菌种中，一半在最新版本的伯杰手册描述了其特征[2]。重要的是，准确的分类学帮助研究人员认识到，与在人类中发现的其他菌种相比，达卡气单胞菌（*Aeromonas dhakensis*）出现的频率更高，毒性更强[6-7]。该菌以前被报告为“阿拉伯糖阴性”的嗜水气单胞菌样细菌，因而被误认为是嗜水气单胞菌（*A. hydrophila*）[8-11]。本章中的信息应该能阐明那些与人类疾病最相关的菌种的鉴定和临床意义（表 42-1）。自本手册第 11 版出版以来新增加的气单胞菌种包括水生气单胞菌（*A. aquatica*）、栖水气单胞菌（*A. aquatilis*）、穴居气单胞菌（*A. cavernicola*）、*A. crassostreae*、*A. enterica*、芬兰气单胞菌（*A. finlandiensis*）、*A. intestinalis*、湖气单胞菌（*A. lacus*）、*A. lusitana* 和 *A. rivipollensis*[12-14]。

表 42-1　气单胞菌属[a]

微生物[d]	人类分离株（肠外的/粪便）	人类病原体（肠外的/粪便）	人类标本中发现率	对动物、鱼和爬行类动物的致病性
嗜水气单胞菌复合群				
嗜水气单胞菌嗜水亚种	是/是	是/是	常见	是
嗜水气单胞菌蛙亚种	否	否	罕见	是
达卡气单胞菌[b]	是	是	常见	是
兽类气单胞菌	否/是	—[d]/否	罕见	是
杀鲑气单胞菌[c]	否/是	否/否	罕见	是
杀鲑亚种				是
无色亚种				是
日本鲑亚种				是
史密斯亚种				是
溶果胶亚种				否
豚鼠气单胞菌复合群				
豚鼠气单胞菌	是/是	是/是	常见	是

*本章包含 Amy J. Horneman 在本手册第 11 版第 40 章中所呈现的部分内容

（续 表）

微生物[d]	人类分离株（肠外的/粪便）	人类病原体（肠外的/粪便）	人类标本中发现率	对动物、鱼和爬行类动物的致病性
中间气单胞菌	否/是	—/是	罕见	否
A. rivipollensis	是/是	是/是	罕见	否
嗜泉气单胞菌	是	否/—	很罕见	否
威隆气单胞菌复合群				
威隆气单胞菌温和生物型	是	是	常见	是
威隆气单胞菌威隆生物型	是	是	罕见	否
简达气单胞菌	是	是/未知	很罕见	否
脆弱气单胞菌	是	是/是	很罕见	否
舒伯特气单胞菌	是/否	是/—	很罕见	否
多样气单胞菌	是/否	是/—	罕见	否
鳗鱼气单胞菌	是/否	否/—	1例	否
MiscellaneousAeromonas species				
异常嗜糖气单胞菌	否/是	—/否	很罕见	是
澳大利亚气单胞菌	否/否	—	—	否
水生气单胞菌	否/否	—	—	未知
栖水气单胞菌	否/否	—	—	未知
双壳贝气单胞菌	否	否	—	否
穴居气单胞菌	否/否	—	—	否
A. crassostreae	否/否	—	—	未知
A. enterica	否/是	否/是	未知	未知
A. finlandiensis	否/否	—	—	未知
河流气单胞菌	否	否	—	否
A. intestinalis	否/是	否/是	未知	未知
A. lacus	否/否	—	—	未知
A. lusitana	否/否	—	—	未知
软体动物气单胞菌	否	否	—	否
栖鱼气单胞菌	否	否	—	是
波氏气单胞菌	是	是	很罕见	否
小溪气单胞菌	否/否	—	—	否
萨纳雷利气单胞菌	是/否	是/否	罕见	否
猴气单胞菌	否	否	—	否
温和气单胞菌	否/否	—	—	否
隐蔽气单胞菌	是	否	很罕见	否
台湾气单胞菌	是/否	是/否	罕见	否

注：[a] DNA杂交群编号不再具有实际用途，威隆气单胞菌温和生物型是小鱼气单胞菌和库文气单胞菌的同义种名；脆弱气单胞菌是肠棕气单胞菌的同义种名，DNA杂交群11气单胞菌由嗜泉气单胞菌和鳗鱼气单胞菌类似微生物组成，为了简便该组未纳入表格。[b] 达卡气单胞菌之前被认为是水族馆气单胞菌和嗜水气单胞菌达卡亚种。[c] 在37℃下生长的杀鲑气单胞菌有动力的菌株，类似于从人类粪便中分离出来的嗜水气单胞菌临床菌株；这些菌株可以使用表42-3中的测试来区分。[d]—. 不适用

有重要临床意义之前称作温和气单胞菌（*Aeromonas sobria*）的菌株，事实上应报告为威隆气单胞菌温和生物型（*Aeromonas veronii* biovar *sobria*）（水解七叶苷和鸟氨酸脱羧酶阴性，精氨酸双水解酶阳性）。几乎所有的快速鉴定系统，除了API 20E（生物梅里埃公司，北卡罗来纳州达勒姆）外，都已将温和气单胞菌的鉴定改为威隆气单胞菌温和生物型。该菌的鉴定非常重要，因为威隆气单胞菌温和生物型可引起较严重的肠道外感染[15-16]。

二、属的描述

气单胞菌属细菌是革兰阴性兼性厌氧菌，呈杆状或球杆状，末端钝圆（宽0.3～1.0 μm，长1.0～3.5 μm），呈单个、成对排列，很少呈短链状排列。大部分菌种动力阳性，有一根1.7 μm长的

极端鞭毛，但是固体培养基上的幼龄培养物可以形成周鞭毛，并可出现侧鞭毛。气单胞菌通常氧化酶阳性，触酶阳性，一般对 150 μg 弧菌抑制剂 2,4-二氨基-6,7-二异丙基蝶啶（O/129）耐药[2]。

气单胞菌属具有强大的代谢能力，以及快速在各种物表和宿主定植的能力[17]。它们是化能有机营养菌，氧化发酵葡萄糖，可分解许多碳水化合物尤其是葡萄糖产酸常产气，还原硝酸盐为亚硝酸盐；产生多种胞外酶，如芳基酰胺酶、淀粉酶、脱氧核糖核酸酶、酯酶、肽酶、蛋白酶、几丁质酶、软骨素酶和溶血素。产生的主要细胞脂肪酸为棕榈酸（16∶0）、十六烯酸（16∶1）和十八碳烯酸（18∶1）。人类（嗜温的）菌株在 10～42℃生长，但偶有分离株在 22～25℃时生化反应更有活性。源自鱼和环境的嗜冷菌株［波氏气单胞菌（*Aeromonas popoffii*）和杀鲑气单胞菌（*Aeromonas salmonicida*）］最适宜的生长温度是 22～25℃，很少能在 37℃以上生长。其在 28℃、pH 4.9～9.0、含盐 0～4%的脑心浸出液肉汤中可生长。根据基因组草图估计气单胞菌的基因组大小范围为 3.90［河流气单胞菌（*Aeromonas fluvialis* LMG 24681^{T}）］～5.18［栖鱼气单胞菌（*Aeromonas piscicola* LMG 24783^{T}）］Mbp，平均为 4.51 Mbp。DNA G+C mol% 含量为 57%～63%[2,3]。（译者注：原文存在错误，应为该种的模式株，书写需要加菌株名称。菌株名称引自原参考文献，T 为模式菌株。）

三、流行病学与传播

气单胞菌属为水生生态系统中的常居菌，在全球范围内广泛分布于地下水、水库、清洁或污染的湖泊和河流等中，也可以在海洋环境中被发现，但只存在于微咸水或低盐的海水中。大多数气单胞菌，特别是那些与人类感染相关的气单胞菌，存在于各类新鲜农产品、肉类（如牛肉、家禽和猪肉）、奶制品（如生奶和冰淇淋）[17]及饮用水中[18-20]。威隆气单胞菌温和生物型是医用水蛭肠道内的主要共生菌，当水蛭治疗发生感染时，气单胞菌属就与医院人畜共患病有关[21]。但应该注意的是，这些感染大多数是由嗜水单胞菌引起的，可能是因为它的毒性更强，即使它在水蛭中的分布密度很低。蛇咬伤也可能引起气单胞菌相关感染，因为它也定植在蛇的口腔中。也有报道它可感染青蛙、猪、牛、鸟类和海洋动物[17]。

无论送检的标本是粪便还是肠道外标本，大多数气单胞菌临床感染都与一些水源环境暴露有关，少数情况与摄入的食物有关。“水－人传播”的模式已得到证明[20]。大多数研究表明，标本中气单胞菌的检出率与季节相关，主要在气温较温暖的月份检出[22]。这些季节的温度是嗜温性气单胞菌最适宜生长的温度。因此，这也增加了人们休闲度假时暴露于这些细菌的可能性，使得这些水生微生物的定植和（或）感染风险增加。

由于气单胞菌感染在美国或其他大多数国家都不需要报告，故全球气单胞菌感染的真实发病率不清楚。据估计，2004 年英国的英格兰/威尔士和美国的气单胞菌脓毒血症发病率为 1.5/100 万[17]。然而，任何发病率的估计都很可能是偏低的。

四、临床意义

气单胞菌属是环境条件致病菌，涉及多种类型的疾病，包括胃肠炎和各种肠道外感染，其中血液和伤口感染是最常见的。感染人最常见的是豚鼠气单胞菌（*Aeromonas caviae*）、达卡气单胞菌、嗜水气单胞菌和威隆气单胞菌温和生物型，占 90%以上[6,17]。

（一）胃肠炎

气单胞菌在胃肠炎中的作用受到质疑，因为接受高浓度的气单胞菌试验的志愿者并未出现肠道症状[23]，且暴发感染的报道也很少。2007 年的一项研究对气单胞菌与腹泻相关性的数据与理论进行了总结[24]。最近的一项研究使用针对微生物感染与急性疾病的剂量反应模型重新评估了气单胞菌的肠道致病能力，证实了气单胞菌的肠道致病性[25]。

气单胞菌胃肠炎可表现为急性水样腹泻（最常见）、痢疾样疾病或慢性疾病。急性水样腹泻患者的粪便是不成形的，没有红细胞和白细胞，伴随症状包括腹痛（60%～70%）、发热和呕吐（20%～50%）、恶心（40%）[17,26]。在类似志贺菌病的痢疾样腹泻的病例中，患者有剧烈腹痛，粪便为含多形核白细胞的黏液血便。尽管大多数腹泻病例是自限性的，但儿童、老年人和免疫受损患者常需要抗

菌药物联合支持治疗[17]。

与这些感染相关的最常见细菌是豚鼠气单胞菌，其次是威隆气单胞菌温和生物型。印度的另一项大型研究发现，在住院腹泻患者中分离到7种不同的气单胞菌，其中豚鼠气单胞菌最多，其次是嗜水气单胞菌和威隆气单胞菌温和生物型[27]。在巴西发生的涉及2170例的大规模急性腹泻暴发中，有19.5%的病例分离到气单胞菌[28]。西班牙的一项大型旅行者腹泻研究发现，气单胞菌占旅行者腹泻的2%，其主要菌种是威隆气单胞菌温和生物型和豚鼠气单胞菌[26]。在儿童中，豚鼠气单胞菌感染甚至类似于炎性肠病[29]。威隆气单胞菌温和生物型可能与罕见的霍乱样疾病相关，伴腹痛(60%)和发热、恶心(20%)[16]。

10%～15%的霍乱样或痢疾样腹泻患者合并其他肠道病原菌感染。气单胞菌的致病性仍知之甚少，研究方法与试验设计的准确性可能使数据产生混淆。

气单胞菌腹泻的并发症包括溶血性尿毒症综合征[30,31]、需要肾移植的肾病和结肠炎[17,32]。这些严重感染通常与嗜水气单胞菌或威隆气单胞菌温和生物型有关。此外，在初次感染几个月后患者还会发生顽固的间歇性腹泻，可以持续数月或数年。有些发作与发病前出国旅行有关，但与慢性腹泻相关的风险因素或基础疾病尚不清楚，由气单胞菌引起的慢性腹泻发生率也是未知的[17]。

(二)肠道外感染

气单胞菌脓毒症在免疫功能正常的人群中很少发生；大部分病例是肝病、糖尿病或血液系统恶性肿瘤患者，并可伴有坏死性筋膜炎[33-34]。也有气单胞菌菌血症无合并症患者的报道，但他们要么是孕妇[35]，要么是老年人[36-37]。菌血症的来源绝大多数都是肠道，通过肝胆疾病或腹膜炎菌群移位，或通过伤口感染(非常少见)。从脓毒症患者中分离出的气单胞菌有豚鼠气单胞菌、威隆气单胞菌温和生物型、达卡气单胞菌和嗜水气单胞菌，培养出多种细菌也比较常见(30%)[36]。

外伤性损伤(即使是微不足道的小伤口)后接触水源常引起伤口感染，主要分离菌是达卡气单胞菌[以前是水族馆气单胞菌(*A. aquariorum*)]、威隆气单胞菌和嗜水气单胞菌。这些感染可从单纯的蜂窝织炎到预后不良的肌坏死性感染和坏死性筋膜炎[38-39]。发生感染的情况如下：①娱乐或职业活动或严重创伤(如车祸伤)后的散发伤口感染；②泥地足球引起的伤口感染暴发[40]；③自然灾害后的伤口感染(如2004年亚洲海啸幸存者[41]、2005年新奥尔良卡特里娜飓风幸存者[42]和2008年中国四川地震幸存者[43])；④术后使用医用水蛭以增加手术部位血供导致的伤口感染，发生率在4.1%～36.2%，主要是威隆气单胞菌温和生物型或嗜水气单胞菌[20,44]。最令人担忧的是接受水蛭治疗后的患者中出现耐环丙沙星气单胞菌的报道数量在增加[45-47]。调查表明，17%～52%的气单胞菌伤口感染是单一病原菌[17,36]，而复数菌感染可能导致更严重的临床症状[48,49]。

腹腔感染包括：①胆囊炎和胆管炎，发生在因胆结石或肿瘤而受压迫的患者中(病死率为0～10%)；②胰腺脓肿；③自发性细菌性腹膜炎(病死率为20%～56%)。这些感染常伴随菌血症。其他肠道外感染包括眼部感染，如与角膜接触镜相关的角膜炎、呼吸道和尿路感染、脑膜炎、化脓性关节炎、骨髓炎、肺炎、心内膜炎、门静脉脓毒症、手术部位感染和温泉浴毛囊炎[50-61]。

五、标本的收集、运输和储存

气单胞菌在标本中活性良好，任何常用的转运培养基(Amies、卡-巴、改良的Stuart和甘油缓冲生理盐水)都可用于运输，一般认为粪便标本使用卡-巴运送培养基最好(第19章)。粪便比直肠拭子更有利于肠道病原体的分离；粪便应在疾病的急性期收集。大多数菌株在室温(20～25℃)和培养箱温度(35～37℃)下生长良好。室温或冷藏不适合实验室菌株的长期(>1个月)保存，推荐将气单胞菌置于培养基(如30%甘油的胰蛋白酶大豆肉汤)在−80℃以下长期保存。

六、直接检查

对伤口或皮肤/浅表标本或血培养阳性标本直接进行显微镜检查并没有发现显著的特点，因为革兰阴性直杆菌伴或不伴白细胞，这与可以引起类似感染的其他肠道致病菌和假单胞菌的表现没什么不同。

尽管已经有各种 DNA 探针和多重 PCR 方法用于鉴定来自水、食物或动物源性的气单胞菌（尤其是用于鉴定肠毒素的基因），但尚无广泛认可的抗原检测和（或）核酸检测方法可用于准确鉴定临床标本中的病原菌。

七、分离程序

气单胞菌通常在多种肠道鉴定和选择性培养基中生长良好，尽管在这些培养基上菌株发酵蔗糖和（或）乳糖类似于非致病菌。以前认为含 20 μg/ml 氨苄西林血平板有助于分离气单胞菌；然而，有小部分气单胞菌对氨苄西林敏感，某些特定的气单胞菌菌种，如脆弱气单胞菌（*Aeromonas trota*）对氨苄西林固有敏感[62-63]。近期一项环境取样检测气单胞菌的研究表明，当氨苄西林用作选择性抑制剂时，相当一部分（17.3%）气单胞菌（至少一些环境菌株）不能分离出来[64]。因此，在做粪便培养检测作为肠道致病菌的有临床意义的气单胞菌时，实验室应谨慎使用含有氨苄西林的培养基。

改良的头孢磺啶-氯苯酚-新生霉素琼脂（cefsulodin-irgasan-novobiocin，CIN）（头孢磺啶由 15 μg/ml 调整为 4 μg/ml）也是一种气单胞菌良好的分离培养基。在该培养基上，气单胞菌菌落呈粉红色中心，边缘清晰，不均匀，但形态上和小肠结肠炎耶尔森菌不能区分。可以将 CIN 琼脂在 25℃孵育以促进耶尔森菌的生长，但气单胞菌在 25℃、24 h 也同样能生长。气单胞菌琼脂可以从 Lab-M（http://www.labm.com）获得，是一种相对较新的 CIN 琼脂替代品，使用 D-木糖（气单胞菌不发酵）作为鉴别特征[65]。

由于大多数临床相关的气单胞菌是 β-溶血的，包括越来越多的豚鼠气单胞菌，血琼脂上的 β-溶血菌落应该用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）或氧化酶和斑点吲哚试验来筛选。2 个试验均阳性的菌落则需要进一步鉴定，但偶尔也会分离到吲哚阴性的豚鼠气单胞菌，几乎所有已知的舒伯特气单胞菌（*Aeromonas schubertii*）（罕见，通常与严重的水接触性外伤感染相关）均为吲哚阴性[66]。硫代硫酸盐-枸橼酸盐-胆盐-蔗糖培养基通常对气单胞菌有抑制作用。对预期病原体载量较少的人群（携带者、恢复期及亚临床感染患者）可用碱性蛋白胨水进行增菌；然而，对于急性腹泻的患者，没有必要增菌[67]。一些报道涉及 2 种不同气单胞菌的感染（5%～10%），可能会导致更严重的疾病[48-49]。因此，尽管分离株可能存在双态性，但也证明了在严重感染情况下在培养物中寻找不同的菌种是合理的。

八、鉴定

一般来说，基于核酸扩增测序的方法，即用纯培养物进行管家基因测序，是在种的水平鉴定气单胞菌最准确的方法。如果可能，无论何时需要鉴定到种的水平，这些方法都应该是首选的。传统的生化系统和 16S rRNA 基因测序效果最差，即使当使用补充的测试也是如此，它们需要很长的时间才能获得结果，同时数据库也很少更新。MALDI-TOF MS 显示出最好的时间/结果比（性价比最高），但系统之间的性能有所不同，同时数据库必须更新（见“种水平的鉴定”）[68]。

（一）菌属的鉴定

气单胞菌是发酵葡萄糖、氧化酶阳性、动力阳性、革兰阴性的杆菌，耐 O/129。无论是基于 16S RNA 基因测序或管家基因测序的核酸扩增方法，还是基于 MALDI-TOF MS 的检测方法，对气单胞菌鉴定到属的水平都具有优异的性能。传统的生化反应也非常不错，但也有一些需要注意的地方。气单胞菌最容易与弧菌和邻单胞菌混淆。邻单胞菌 Moeller 赖氨酸、鸟氨酸、精氨酸和 m-肌醇发酵试验均阳性，容易和气单胞菌区分。弧菌与气单胞菌的鉴别较为困难，特别是河流弧菌（*Vibrio fluvialis*）和豚鼠气单胞菌，在实验室中唯一能鉴定的方法是商业鉴定系统[如 API-20E（生物梅里埃公司）；MicroScan Walk/Away NFC47 鉴定板（贝克曼库尔特公司）][69-71]。对弧菌抑制剂 O/129（150 μg）耐药，拉丝试验阴性（0.5% 脱氧胆酸钠），不能在≥6% 盐浓度生长，通常提示为气单胞菌属。然而 O139 群霍乱弧菌（霍乱毒素阳性，生长可不需要盐，弧菌抑制剂 O/129 耐药）是一个重要的例外，但该菌的脱羧酶模式（赖氨酸和鸟氨酸阳性）、精氨酸双水解酶阴性、发酵葡萄糖不产气、不发酵水杨苷，可与大部分气单胞菌鉴别。不幸的是，鸟氨酸脱羧酶阳性的威隆气单胞菌威隆生

物型菌株用 API-20E 快速鉴定板(生物梅里埃公司)常被错误地鉴定成霍乱弧菌,而且显示是非常好的鉴定,这需要补充血清试验和(或)其他生化反应来确认。威隆气单胞菌威隆生物型黏丝试验阴性,O/129 耐药,发酵葡萄糖产气,生长不需要提供盐,在硫代硫酸钠-枸橼酸盐-胆盐-蔗糖琼脂(TCBS)上生长受抑制,霍乱弧菌刚好相反。

(二)种水平的鉴定

16S rRNA 基因测序对鉴定气单胞菌的种水平是令人失望的[72]。这是由于气单胞菌 16S rRNA 基因频繁发生变化的异质性造成的;要谨慎使用单基因做超出属水平的鉴定[73-74]。建议使用其他管家基因组合如 *gyrB* 和 *drpoD*、*dnaJ*、*rpoB* 和 *cpn*60[78]作为分子标志物,或更加广泛的方法如多位点进化分析(7 个基因位点),因其有高分辨率[75-78]。与 16S rRNA 基因相比,这些基因具有 2 个优点:它们表现出更高的多样性,能够区分不同菌种,同时它们存在于单拷贝中,这消除了基因组内多样性的风险。例如,1.1 kb 的 *gyrB* 序列对于大多数菌株表现出小于 2.6%的种内多样性和大于 3%的种间多样性[79]。上述任何基因都可以准确地识别种水平的气单胞菌,应用最广泛的是 *gyrB*(2017 年大于 3000 NCBI 条目)。错误的鉴定与水平基因转移有关,据报道在被测基因中发生的频率高达 2%[80]。因此,鉴定结果应该至少用另一个基因来验证,或在某些情况下最好用多位点进化分析(如用于发表的病例报道或流行病学研究)。

MALDI-TOF MS 在 2007 年首次被应用于气单胞菌菌种的鉴定[81],并于 2011 年得到进一步验证[82],2012 年建立了快速 MALDI-TOF MS 气单胞菌数据库,用于临床和环境中的分离株[83]。到目前为止,2 个通过美国 FDA 认证的系统是 Biotyper 系统(布鲁克公司)和 IVD 3.0 Vitek MS(生物梅里埃公司),其性能与数据库内容大不相同。一些局限已被认识到。这 2 个系统的数据库都是不完整的:本属的 36 个菌种,Biotyper 系统和 IVD 3.0 Vitek MS 系统分别缺少 20 个和 29 个,与人感染相关的 16 个菌种中,分别缺少 7 个和 12 个。重要的是,达卡气单胞菌在 2 个系统中都没有数据。

针对 Biotyper 系统对气单胞菌的鉴别性能已进行了广泛评估。达卡气单胞菌被错误地识别为嗜水气单胞菌或水族馆气单胞菌[84]。未录入数据库的菌种通常被错误地鉴定为一个高鉴定值的菌种,这可能是因为气单胞菌的菌种都比较相近。有一个综述可查到未录入数据库的菌株如何被 Biotyper 系统错误鉴定[84]。此外,人们认识到菌种分类之间相对较低的分辨力,其特征是得分差异的大小也反映了菌种之间的相似程度[82-84]。当开始的 2 个匹配项不同时,鉴定结果应该用提取程序(extraction procedure)来检查。当问题仍然存在时,如第 1 个匹配项对应于 80%的识别,则该方法的结果可接受[83]。尽管存在这些缺陷,但在温带国家的流行病学调查显示 Biotyper 系统的总体准确率接近 90%[82,83],但在达卡气单胞菌检出率高的温暖的地区,预计该系统的鉴定准确度会较低。

迄今为止,IVD 3.0 VITEK MS 尚未对气单胞菌属菌种鉴定进行广泛评估,但是,考虑到数据库内容,鉴定到种水平的性能预计会令人失望,因为制造商目前承认该系统:①不能正确区分豚鼠气单胞菌和嗜水气单胞菌;②对威隆气单胞菌菌株的鉴定能力低。

准确性的不足主要与数据库的缺失有关。气单胞菌产生的光谱显示出的一些特定峰,可用于菌株菌种水平的鉴定。例如,由于有特定的峰,Biotyper 系统可以准确地鉴定出达卡气单胞菌[68]。数据库的缺失可以通过使用内部数据库来克服。然而,内部数据库的开发和验证可能是比较困难的,故用户在采用此策略之前应考虑到这一点。2 个系统的数据库都必须更新,至少应包含与人类疾病有关的最新定义菌种,如达卡气单胞菌和萨纳雷利气单胞菌(*Aeromonas sanarelli*)。

生化反应的方法所需鉴定时间最长且鉴定性能最低。在鉴定出气单胞菌后,可以用少量的生化反应把气单胞菌归到 3 种主要复合群(表 42-2)。如果有必要,在表 42-3 粗体字显示的试验中有更多的鉴别试验可以区分每个群内的不同菌种,这些试验可以取代早前公布的菌种鉴定结果[66]。一项研究比较了 6 种商用系统鉴定 87 株气单胞菌临床分离株的准确性,种鉴定正确率只有 67.8%~91.9%,表明这些商品化系统使用的数据库和分类学陈旧,计算方法不精确,选择的试验不实用[71]。但该研究报道选择 7 个常规试验,

采用简单的AerokeyⅡ双歧索引表对上述87株气单胞菌临床分离株进行鉴定，种准确率可高达95.5%[85]。达卡气单胞菌与嗜水气单胞菌的区别在于其能利用尿酸和不能利用L-阿拉伯糖产酸。

表 42-2 气单胞菌菌群生化鉴定表

试验	菌株鉴定后属于[a]：		
	嗜水气单胞菌家族(嗜水气单胞菌、达卡气单胞菌、兽类气单胞菌、杀鲑气单胞菌)	豚鼠气单胞菌家族(豚鼠气单胞菌、中间气单胞菌、嗜泉气单胞菌)	威隆气单胞菌家族(威隆气单胞菌HG8[b]、简达气单胞菌、舒伯特气单胞菌、脆弱气单胞菌)
七叶苷	87(92,100,81,85)	71(76,55,78)	0
VP试验	75(88,100,63,62)	0	54(88,87,17,0)
葡萄糖(产气)	81(92,95,69,77)	16(0,0,78)	87(92,100,0,69)
L-阿拉伯糖	93(84,0,100,100)	96(100,100,78)	4(12,0,0,0)

注：[a] 第一个数字是每个家族对每种特性所有细菌阳性率；括号里的数字是家族中所列的每种菌的阳性率。数据来源于参考文献[66]中的表5和文献[8]的引用和修改。[b] Biovar sobria(DNA杂交群8)型。威隆气单胞菌威隆生物型(DNA杂交群10型)与威隆气单胞菌温和生物型的区别是前者鸟氨酸脱羧酶和七叶苷水解阳性，精氨酸水解酶阴性

九、分型系统

目前，对气单胞菌进行分型的可靠方法包括使用XbaⅠ、SwaⅠ或SpeⅠ的脉冲场凝胶电泳和基于PCR的技术，包括ERIC-PCR、盒子元件PCR、基因组重复序列-PCR(REP-PCR)和结合几种重复元件的方法(如ERIC和REP)。2015年的一篇扩展综述对现有数据进行了概述总结[86]。

十、血清学试验

检测气单胞菌抗体(试管凝集、免疫印迹和酶联免疫法)的血清学分析的敏感性和特异性低，结果不可靠。

十一、抗菌药物敏感性

表42-4中根据几个研究给出了气单胞菌属的综合抗菌药物敏感谱，但这些研究仅包括明确到种水平的菌株[87-90]。气单胞菌菌株可以表达3种染色体介导的可诱导β-内酰胺酶，包括Bush分类中1群的C类头孢菌素酶、2d亚群的D类青霉素酶(OXA酶)和3群的B类金属β-内酰胺酶(碳青霉烯酶)。这些耐药基因是有种特异性的，如CphA金属β-内酰胺酶存在于嗜水气单胞菌、达卡气单胞菌和威隆气单胞菌中，但不存在于豚鼠气单胞菌(表42-4)[91]。此外，气单胞菌中这些β-内酰胺酶，尤其是碳青霉烯酶，可能无法通过常规的药物敏感性试验检测出来[92]。

从定植或感染的临床标本及水源中分离的菌株偶尔会有因产获得性超广谱β-内酰胺酶(ESBL)而对超广谱头孢菌素耐药的报道[93-95]。最近，从世界不同地方的临床标本和水环境中已经分离出豚鼠气单胞菌，携带有染色体介导的NDM-1或移动元件(质粒或整合子)介导的VIM-1金属β-内酰胺酶[95-97]。因为该菌可发生多重耐药，并通过水或污水系统传播，而且有将耐药性传递到临床上其他重要的革兰阴性杆菌的潜力，这值得临床医生关注[93-94,96]。气单胞菌临床分离株产β-内酰胺酶的复杂性导致对广谱β-内酰胺类药物耐药，故强烈建议常规进行体外药敏试验，并在某些情况下，同时还应额外检测ESBL和碳青霉烯酶[98]。

环丙沙星常用来治疗革兰阴性菌的感染，最初报道对所有气单胞菌都有效，当时美国和大多数欧洲的研究几乎都没有耐药性报告[36,87-88,99]。然而，早在1996年就报道了亚洲有2%～3%的豚鼠气单胞菌、嗜水气单胞菌和威隆气单胞菌温和生物型对环丙沙星耐药[89]。如前所述，水蛭治疗后环丙沙星耐药菌株感染的报道越来越多。由于建议将环丙沙星用于预防用药，故这些反复出现的报道值得关注并进行预防策略的修订，直到环丙沙星耐药菌株的来源得到控制(如参考文献[45-47]中所述)。对其他抗菌药物(如氨基糖苷类、四环素、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑)的敏感性可能因地理

表 42-3　气单胞菌种群鉴定试验

试验	结果[a]										
	嗜水气单胞菌家族				豚鼠气单胞菌家族			威隆气单胞菌家族			
	嗜水气单胞菌	达卡气单胞菌[b]	兽类气单胞菌	杀鲑气单胞菌	豚鼠气单胞菌	中间气单胞菌	嗜泉气单胞菌	威隆气单胞菌[c]	简达气单胞菌	舒伯特气单胞菌	脆弱气单胞菌
利用											
枸橼酸盐	**+(92)**	ND	**V(38)**	**+(85)**	**+(88)**	**V(82)**	**−(0)**	V(52)	+(87)	V(58)	+(94)
DL-乳酸	**V(84)**	+(100)	**−(0)**	**−(0)**	**+(96)**	**V(56)**	**−(0)**	−(0)	−(7)	V(58)	+(88)
尿刊酸	**V(16)**	−(0)	**+(94)**	**+(100)**	**+(100)**	**+(100)**	**−(0)**	−(0)	−(7)	−(0)	V(75)
葡萄糖氧化	**V(64)**	ND	**−(13)**	**−(0)**	−(0)	−(0)	**−(0)**	V(60)	V(60)	−(0)	−(0)
葡萄糖产气	+(92)	+(95)	V(69)	V(77)	−(0)	−(0)	**V(78)**	**+(92)**	**+(100)**	**−(0)**	**V(69)**
吡嗪酰胺酶试验	V(24)	−(≤15)	V(50)	V(31)	**+(88)**	**V(18)**	**+(100)**	ND	ND	ND	ND
吲哚试验	+(96)	+(98)	+(100)	+(100)	V(84)	+(100)	+(89)	**+(100)**	**+(100)**	**V(17)**	**+(100)**
VP 试验	+(92)	+(100)	V(63)	V(62)	−(0)	−(0)	−(0)	**+(92)**	**+(87)**	**V(17)**	**−(0)**
酯酶(玉米油)试验	+(100)	ND	+(88)	+(92)	V(76)	V(82)	+(89)	**+(92)**	**+(100)**	**+(100)**	**−(0)**
产酸											
纤维二糖	**−(4)**	−(0)	**V(38)**	**V(69)**	+(100)	+(100)	V(56)	**V(20)**	**V(20)**	**−(0)**	**+(100)**
乳糖	**V(64)**	−(0)	**−(13)**	**+(92)**	V(60)	V(64)	−(11)	−(12)	−(0)	−(0)	−(0)
L-鼠李糖	**V(24)**	−(0)	**V(69)**	**−(0)**	−(0)	−(0)	V(22)	−(0)	−(0)	−(0)	−(0)
D-山梨醇	**−(0)**	−(0)	**−(0)**	**+(85)**	−(4)	−(0)	−(0)	−(0)	−(0)	−(0)	−(0)
葡萄糖-1-磷酸盐	ND	ND	ND	ND	**−(4)**	**+(100)**	**+(100)**	ND	ND	ND	ND
葡萄糖-6-磷酸盐	ND	ND	ND	ND	**−(4)**	**+(100)**	**+(100)**	ND	ND	ND	ND
乳果糖	ND	ND	ND	ND	**V(68)**	**V(55)**	**−(0)**	ND	ND	ND	ND
D-甘露糖	+(100)	+(100)	+(100)	+(100)	**V(32)**	**+(100)**	**+(100)**	ND	+(100)	+(92)	+(100)
甘油	+(96)	+(100)	+(100)	+(100)	V(68)	V(55)	−(11)	**+(100)**	**+(100)**	**−(0)**	**+(94)**
D-甘露醇	+(96)	+(100)	+(100)	+(100)	+(100)	+(100)	+(100)	**+(100)**	**+(100)**	**−(0)**	**V(69)**
蔗糖	+(100)	+(98)	+(94)	+(100)	+(100)	+(100)	V(33)	**+(100)**	**−(0)**	**−(0)**	**V(19)**
氨苄青霉素[f]	+(100)	+(98)	+(94)	+(85)	+(100)	V(73)	+(100)	**+(100)**	**+(93)**	**+(92)**	**−(6)**

注：[a] 数据根据参考文献[66]的表 2,6,7,8 和文献[8]改编。+. ≥85% 菌株阳性；−. <15% 阴性；V. 15%～85% 阳性(48 h 的结果)。括号中的数值为试验最后一天读出的菌株阳性率，葡萄糖 2 天；DL-乳酸和尿刊酸 3 天；枸橼酸盐 4 天；碳水化合物、吲哚和酯酶 7 天；吡嗪酰胺酶 2 天；氨苄青霉素[f](10 μg 氨苄青霉素耐药)1 天；VP 试验 3 天。ND. 未做。对每一种气单胞菌家族，家族中菌种间鉴别反应应用了加粗字体。[b] 达卡气单胞菌(曾称为嗜水气单胞菌达卡亚种/水族馆气单胞菌)七叶苷阳性，L-阿拉伯糖和 L-岩藻糖利用阴性，L-阿拉伯糖发酵阴性，尿刊酸利用阳性[8]。[c] Biovar sobria(DNA 杂交群 8 型)。威隆气单胞菌威隆生物型(DNA 杂交群 10 型)与威隆气单胞菌温和生物型的区别是前者鸟氨酸脱羧酶和七叶苷水解阳性，精氨酸水解酶阴性

表 42-4 气单胞菌表达的β-内酰胺酶型别及其对β-内酰胺类抗生素的敏感性

特征[a]	种属[b]						
	豚鼠气单胞菌	达卡气单胞菌	嗜水气单胞菌	简达气单胞菌	脆弱气单胞菌	舒伯特气单胞菌	威隆气单胞菌
Ambler 类(酶的类型)							
D 类(苯唑西林酶)	+	+	+	+	−	+	+
C 类(头孢菌素酶)	+	+	+	+	+	−	−[c]
B 类(碳青霉烯酶)	−	+	+	+	−	−	+
通常的易感性(野生型)							
氨苄西林	R	R	R	R	S	R	R
替卡西林或哌拉西林	V	V	V	V	S	V	V
头孢噻吩或头孢唑林	R	R	R	R	R	S	S
头孢西丁	V	V	V	V	V	S	S
碳青霉烯类[d]	S	V	V	V	S	S	V

注：[a] 从参考文献[17][91][93]和[98]编译的数据。[b] 耐药，R. 或敏感，S 为≥90%的所有分离株都是耐药或敏感的。可变，V 为10%～90%的分离株是敏感的。[c] 头孢菌素酶基因存在于基因组中，但不表达。[d] 碳青霉烯酶的表达通常很弱(低水平)，常规方法可能检测不到

区域而异。由于有耐药菌株的出现，故有必要对当地的分离株进行药敏试验。临床和实验室标准化委员会(CLSI)试验指南 M45-A2(少见分离菌或苛养菌)有临床主要气单胞菌稀释法和纸片法的药敏试验方法[100]。

十二、结果的评价、解释和报告

肠道内气单胞菌分离株需要鉴定到嗜水气单胞菌复合群、豚鼠气单胞菌复合群或威隆气单胞菌复合群，但不能鉴定成温和气单胞菌(*A. sobria*)，它现在称为威隆气单胞菌温和生物型，属于威隆气单胞菌复合群。对于非复杂胃肠炎病例中的常规分离株，这种水平的鉴定可能就足够了。虽然有非常强的证据表明一些气单胞菌是胃肠道病原菌，但目前没有令人信服的证据表明所有从粪便分离的气单胞菌都与腹泻相关，因为有1%～4%的人群是无症状携带者[17]。因此，粪便中气单胞菌分离株的临床意义解释需要谨慎，必须同时依赖于实验室信息和临床解释。因此，对肠道培养基上分离到的气单胞菌相对数量(少量、中量或优势生长)需要和种(复合群)的鉴定一起报道。对于复杂性的腹泻病例，如长期出血性腹泻的儿童、持续时间>1个月的慢性胃肠炎患者，或是粪便培养阳性的肿瘤患者(该类患者易发生气单胞菌播散性感染)，需要明确鉴定到种。

对于肠道外(如血液或伤口)分离株，按照肠道内相同规则进行气单胞菌菌种的鉴定。尽管不同气单胞菌菌种或菌株在体内、体外的致病力相差很大，但目前仍没有全球通用的标准来明确何时需要将分离株鉴定到种的水平。然而，未来的研究应该将菌株鉴定到种水平，因为现在已经可以通过快速和准确的方法来鉴定一些毒性更强的菌种(如达卡气单胞菌)。至少在下列情况下需要将气单胞菌鉴定到种：①分离自无菌部位(血液和脑脊液)和严重伤口感染(蜂窝织炎和坏死性筋膜炎)的菌株；②表现出不寻常的耐药表型或与医院内感染相关的菌株；③用于新的解剖部位分离到的传统菌种或新种的研究成果的发表。

参考文献请扫二维码查阅

第43章 弧菌属和相关微生物*

CHERYL L. TARR, WILLIAM A. GLOVER Ⅱ, YAN BOUCHER, JOHN J. FARMER Ⅲ

(曾吉 译;杨青、张利军 审校)

一、分类

弧菌科(Vibrionaceae)目前包括 6 个属:弧菌属(*Vibrio*)、发光杆菌属(*Photobacterium*)、盐弧菌属(*Salinivibrio*)、肠弧菌属(*Enterovibrio*)、格里蒙特菌属(*Grimontia*)和别弧菌属(*Aliivibrio*),有 110 多种在细菌命名法中符合命名法的菌种(http://www.baterio.net)。弧菌属是该科的模式属,霍乱弧菌(*V. cholerae*)(包括引起霍乱大流行的菌株)是模式菌种[1]。从人类临床标本常规分离到的菌种存在于 3 个菌属,包括弧菌属(13 种)、发光杆菌属和格里蒙特菌属(每属各 1 种)。进化系统研究表明,弧菌属有多个分支(进化系统意义上独立或不同的群体),这导致了一些菌种重新分类到不同菌属。

二、弧菌科的描述

与临床样本相关的弧菌科细菌为革兰阴性,兼性厌氧,直、弯曲或逗号形杆状,宽 0.5~0.8 μm,长 1.4~2.6 μm,触酶和氧化酶阳性[梅契尼可夫弧菌(*Vibrio metschnikovii*)除外][1]。大部分菌种在液体培养基中有动力,因其有单根或多根端鞭毛。一些菌种的菌株,如副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)和溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*),因有侧生鞭毛,在固体培养基上迁移生长[1,2]。所有弧菌科细菌生长都需要 Na^+,适宜生长的最低浓度范围 0.029%~4.100%[1]。发酵 D-葡萄糖,很少产气,还原硝酸盐为亚硝酸盐(梅契尼可夫弧菌除外),在硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖(TCBS)培养基上生长[霍利格里蒙特菌(*Grimontia hollisae*)除外]。DNA 的 G+C 含量为 38~51 mol%[1]。用于区分有临床意义的弧菌科细菌和系统进化相关菌种或表型相似菌属的关键特征见表 43-1。

三、流行病学、传播和临床意义

本章所述的菌属普遍存在于水环境中,主要是海水。弧菌如霍乱弧菌、外来弧菌(*V. metoecus*)和拟态弧菌(*V. mimicus*)生长只需要极少量 Na^+,可以生长在淡水河流、湖泊和河口、海水中。弧菌科细菌常分离自各种双壳和甲壳贝类,和其他寄生于海洋环境的菌属一样,发病高峰是一年中较温暖的月份。在水环境中,弧菌可单独存在,或与浮游动植物共存[3,4]。在环境中,弧菌可能会进入一种活的非可培养(VBNC)状态,保留基本的细胞代谢过程,但即使在实验室标准培养基上也不能生长[5]。在弧菌中,VBNC 状态最常见于霍乱弧菌,但也在其他致病性弧菌菌种中得到证实,包括副溶血弧菌、拟态弧菌和创伤弧菌(*V. vulnificus*)[6]。VBNC 状态的霍乱弧菌对公众健康构成威胁,因为它可以在人体胃肠道中复苏,但如果用传统的培养方法检测水样却可能会失败[7]。

弧菌科细菌可以分离自各种肠道和肠道外疾病患者。这些疾病包括腹泻、软组织疾病(蜂窝织炎和坏死性筋膜炎)、脓毒症、眼和耳感染[1]。在某些胃肠炎和肠外感染的病例中,可能很难确定

*本章包含 Cheryl L. Tarr, Cheryl A. Bopp 和 John J. Farmer Ⅲ在本手册第 11 版第 4 章中所呈现的部分内容

表 43-1 弧菌属和相关菌属的特点及与其他表型相似菌种的鉴别点[a]

属性	弧菌属	格里蒙特菌属	发光杆菌属	气单胞菌属	邻单胞菌属	肠杆菌科
革兰染色/形态	革兰阴性弯杆菌	革兰阴性弯杆菌	革兰阴性球杆菌	革兰阴性直杆菌	革兰阴性直杆菌	革兰阴性短杆菌
可能引发或与人类肠道内/肠道外感染有关	+	+	+	+	+	+
氧化酶反应	+	+	+	+	+	−
Na^+是否是为生长必需或是刺激生长	+	+	+	−	−	−
TCBS 琼脂上生长	+	V[b]	+	−	−	−
对弧菌抑制剂 O/129 的敏感性[c]	+[d]	+	+	−	+	−
产生酯酶	+	−	V	+	−	V
D-甘露醇发酵	+	−	−	+	−	V

注：[a] 这些是菌属和(或)菌科的一般属性，但也有例外。弧菌属的属性适用于人类临床标本中的菌株，但可能不适用于所有的非临床菌株。+. 大部分菌株阳性；−. 大部分菌株阴性；V. 菌种/菌株的反应可变。[b] 霍利斯格里蒙特菌(*Grimontia hollisae*)在 TCBS 琼脂上一般生长不良或不生长；即使生长，长菌率也可能下降。[c] O/129，2，4-二氨基-6，7-二异丙基蝶啶磷酸盐(可商业购买，150μg 纸片)。[d] 分离自印度和孟加拉国的霍乱弧菌菌株中 O/129 耐药常见；霍乱弧菌 O139 菌株耐药

表 43-2 12 种来自人类临床标本弧菌科细菌的表型试验结果和其他属性[a]

试验	菌株阳性率(%)[b]											
	类志贺邻单胞菌	霍乱弧菌	拟态弧菌	梅契尼可夫弧菌[d]	辛辛那提弧菌	霍利格里蒙特菌	美人鱼发光杆菌	河流弧菌	弗尼斯弧菌	溶藻弧菌	副溶血弧菌	创伤弧菌[e]	哈氏弧菌
吲哚(HIB)[c]	100	99	98	20	8	97	0	13	11	85	98	97	100
VP[c]	0	75	9	96	0	0	95	0	0	95	0	0	50
Moeller													
精氨酸[c]	98	0	0	60	0	0	95	93	100	0	0	0	0
赖氨酸[c]	99	99	100	35	57	0	50	0	0	99	100	99	100
鸟氨酸[c]	95	99	99	0	0	0	0	0	0	50	95	55	0
动力	95	99	98	74	86	0	25	70	89	99	99	99	0
明胶水解[c](22℃)	0	90	65	65	0	0	6	85	86	90	95	75	0
D-葡萄糖，产气	0	0	0	0	0	0	10	0	100	0	0	0	0

（续 表）

试验	菌株阳性率(%)[b]											
	类志贺邻单胞菌	霍乱弧菌	拟态弧菌	梅契尼可夫弧菌[d]	辛辛那提弧菌	霍利格里蒙特菌	美人鱼发光杆菌	河流弧菌	弗尼斯弧菌	溶藻弧菌	副溶血弧菌	创伤弧菌[e]	哈氏弧菌
产酸：													
L-阿拉伯糖	0	0	1	0	100	97	0	93	100	1	80	0	0
纤维二糖	0	8	0	9	100	0	0	30	11	3	5	99	50
乳糖	80	7	21	50	0	0	0	3	0	0	1	85	0
myo-肌醇	95	0	0	40	100	0	0	0	0	0	0	0	0
水杨苷	0	1	0	9	100	0	0	0	0	4	1	95	0
蔗糖	0	100	0	100	100	0	5	100	100	99	1	15	50
ONPG	90	94	90	50	86	0	0	40	35	0	5	75	0
耐盐试验(营养肉汤生长)													
0% 氯化钠	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6% 氯化钠	NA	53	49	78	100	83	95	96	100	100	99	65	100
O/129 敏感性[f]	100	99	95	90	25	40	90	31	0	19	20	98	100

注：[a] 缩写：HIB. 心浸液肉汤；VP. Voges-Proskauer；ONPG. 邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷；NA. 未做。[b] 除非另有说明，菌株阳性率在 36℃孵育 48 h 后检测。大部分阳性反应出现在 24 h 内。[c] 该试验中添加了 1%氯化钠。[d] 这种微生物氧化酶阴性，不能将硝酸盐还原为亚硝酸盐。[e] 生物群 Ⅰ 菌株。[f] 出现抑制圈(纸片含量 150 μg)。类志贺邻单胞菌属的数据来自微生物疾病实验室

分离到的弧菌代表着真正的感染或只是定植，因为它本身就广泛存在于海洋和河口水中。在临床标本中可以分离到的10种弧菌及发光杆菌属和格里蒙特菌属各1个菌种已列在表43-2。最近有其他3种与临床标本有关的菌种将在下面进行描述。肠道外弧菌感染通常与外伤或隐性暴露于海水或河口水有关。食入生海鲜（牡蛎）后可能会发生原发性脓毒症，或伤口感染后可能会发生继发性菌血症。

（一）霍乱弧菌

霍乱弧菌分为200多个血清群，其中只有霍乱弧菌血清群O1和O139可以引起霍乱。但其他血清群也可能导致严重的脱水性腹泻[8]。霍乱与卫生条件差有关，直接接触受污染的用于饮用、洗浴、烹饪和灌溉的地表水是主要的危险因素[9]。

1. O1群霍乱弧菌(*V. cholerae* O1) 在2016年，38个国家向世界卫生组织（WHO）报告了132 121例霍乱病例和2420例死亡病例，其中大多数(54%)来自非洲（http://www.who.int/gho/epidemic_diseases/cholera/cases/en）。1996—2016年，非洲霍乱病例占全世界病例的50%以上；不过在2010—2012年，海地的疫情占了大多数[10]。截至2016年12月，海地共报告了795 794例霍乱，其中死亡9411例。在也门暴发的霍乱疫情已经超过了海地。2016年10月至2017年10月，也门总共报告了922 704例病例，其中2317例死亡（http://www.emro.who.int/health-topics/cholera-outbreak/situation-update.html）。

多数O1群霍乱弧菌感染是无症状的，而这些未被发现的感染可能在霍乱流行疫区充当了持续传染源的角色[11]。严重的霍乱会导致大量的水样腹泻，每天液体丢失可达到每天200 ml/kg体重。若未经治疗，患者会出现衰竭，伴有严重脱水、电解质紊乱、肌肉痉挛疼痛、流泪、皮肤失去弹性和无尿。即使既往健康的成人，脱水也会导致低血容量性休克、酸中毒、循环衰竭和死亡[12]。在美国，从世界上霍乱流行疫区回来的旅行者中会有零星的霍乱病例。传统疗法包括口服补液和（或）静脉补液。

霍乱弧菌O1血清群能引起暴发性腹泻的独特能力，是因为它的染色体上存在毒力基因盒和致病岛。这些区域包含一些关键性决定子，如*ctxAB*基因，编码可导致大量液体和电解质排泄到管腔的霍乱肠毒素；TCP基因簇，包括*tcpA*基因，编码毒素共调节菌毛（toxin-coregulated pilus）的主要蛋白亚单位（负责黏附胃肠上皮）[9]。O1群霍乱弧菌分为稻叶型和小川型2种血清型（第3种血清型，彦岛型很少分离），以及2种生物型即埃尔托（El Tor）型和古典型。古典生物型引起前6次霍乱大流行，而埃尔托生物型（1905年首次分离）导致始于1961年的目前仍在持续的第7次霍乱大流行[9]。最近霍乱弧菌O1群新变种已在非洲和亚洲出现[13]。根据预计的病死率，这些非典型或杂交的埃尔托型菌株可能比大多数埃尔托型菌株的毒力更强[14]。杂交菌株不同于典型的埃尔托型菌株，因为杂交菌种与古典生物型有一些共同的特征（如1株埃尔托型菌株染色体上可以有古典型菌株的*ctxB*基因）[15]。这些杂交菌株可能是通过基因水平转移和重组逐步演变而来[13]。

2. O139群霍乱弧菌(*V. cholerae* O139) 1992年，一种新的霍乱弧菌，血清群O139（最初命名为霍乱弧菌O139孟加拉）在整个亚洲地区出现[16]。该血清群可能是埃尔托型菌株通过基因水平转移从未知的细菌处获得了一种新的菌体抗原和荚膜[16]。O139和O1群菌株携带相似的毒力因子，包括*ctx*和*tcpA*基因[9]。霍乱弧菌O1群和O139群菌株引起的临床症状非常相似，成人更容易感染O139群，因为既往感染O1群霍乱对O139群无保护作用[17]。2002年，O139群菌株再次出现在孟加拉国，造成了约30 000例霍乱病例，主要是老年患者[17]。到目前为止，非洲尚未发现O139群霍乱弧菌感染病例，而在中国出现过O139群霍乱弧菌感染的报告[18]，最近在孟加拉国人群中分离到3株*ctx*阳性的霍乱弧菌O139群菌株，其中包括1例霍乱[19]。

3. 非O1，非O139群霍乱弧菌 不是O1或O139血清群的霍乱弧菌菌株称为“非O1，非O139”群（或简称为“非O1”群），这些菌株很少产生霍乱毒素。虽然有报道其会导致水样腹泻和严重的疾病，但其感染通常比典型霍乱要温和。携带有霍乱毒素基因的非O1群霍乱弧菌，如O75和O141血清群，在美国和其他地方有引起散发的霍乱样疾病的报道[20,21]。感染的危险因素与其他

弧菌相似，包括食用牡蛎和其他生的或交叉污染的海鲜。2011 年，在佛罗里达州阿巴拉契科拉湾发生了一起小规模的 O75 群暴发流行，是由于摄入生的或未煮熟的牡蛎，但腹泻症状较轻，而且也没有病例需要补液或住院治疗[22]。

与 O1 群霍乱弧菌相反，非 O1 群弧菌主要与肠外感染有关，如脓毒症和硬膜外脑脓肿[23,24]。肝病/肝硬化或恶性血液病患者罹患非 O1 群菌血症的风险在增加[24]。这些患者的病死率为 10%～65%[24-25]。也可从耳、伤口、呼吸道和尿中分离出该菌[26]。

(二)拟态弧菌(*V. mimicus*)

拟态弧菌是另一种不嗜盐菌株，除不发酵蔗糖外，表型类似于霍乱弧菌。人类感染不常见，但可以从腹泻患者标本中分离到，其致病作用尚未明确，通常与摄入生的海鲜尤其是生蚝有关。极少数菌株携带 *ctxAB* 基因，可导致霍乱样症状。症状通常包括大量水样腹泻、呕吐和严重脱水。大多数拟态弧菌胃肠炎都是个例报道，但 2004 年在泰国暴发了一次大规模食源性胃肠炎[27]。在这次暴发中，超过 300 人患病，有 24 例患者直肠拭子分离到拟态弧菌。这次暴发推测与食用淡水鱼、海鲜和海鲜汤有关。2010 年，华盛顿州发生了一起与摄入小龙虾有关的小规模暴发，病原菌为能编码霍乱毒素的拟态弧菌[28]。

(三)副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)

副溶血弧菌在亚洲是细菌性食源性肠道感染的主要病原菌，几乎都和摄入生鱼或贝类有关[29]。在日本，50%～70%食源性腹泻病例是由副溶血弧菌引起。在美国，它是临床标本中最常分离的弧菌，主要与水样腹泻相关，也可以从血液、伤口或其他肠道外部位分离到[30]。副溶血弧菌引起的胃肠炎症状常包括恶心、呕吐、腹部绞痛、低热、畏寒。死亡病例非常罕见，但在严重脱水病例中也可能会发生。一般来说仅需要补液治疗，但在有些情况下抗菌治疗可能是有益的。最近一次胃肠炎暴发于一艘邮轮上，22 名乘客因食用阿拉斯加牡蛎而发病[31]。现广泛分布的副溶血弧菌克隆株是 O3:K6 血清型，于 1997 年在全球范围内出现[32]。1996—1999 年期间在中国台湾暴发的由副溶血弧菌引起的食源性疾病中，该血清型比例异常高，这表明它的生态学、流行病学或毒力有些与众不同。其他血清型的血清变异株具有与 O3:K6 大流行克隆株相同的遗传和分子特征[32]。已发现了 20 多种血清变异株(如 O4:K68、O1:K25 和 O14:KUT)，其与 O3:K6 一起继续蔓延整个亚洲，并蔓延至美国、加拿大、墨西哥、俄罗斯、法国、意大利、巴西、智利、秘鲁和莫桑比克[32]。

(四)创伤弧菌(*V. vulnificus*)

创伤弧菌可引起原发性脓毒症和伤口感染，在美国每年由弧菌感染引起的死亡病例中超过 90%与之有关。创伤弧菌引起的原发性脓毒症，即使住院治疗病死率也超过 50%，且多发生在 50 岁以上的男性患者[33]。患者通常有基础疾病，如肝病、免疫抑制、血清铁增加或其他慢性疾病[33,34]。美国 CDC 的数据显示，>95%的患者在发生感染的 7 天内有过摄入牡蛎史。患者的典型表现为突发的发热和寒战、呕吐、腹泻及腹痛。经常出现继发性皮肤损害，并形成大疱和坏死。常发生内毒素性休克，可导致患者迅速死亡。来自皮损部位的活检标本(碎屑)和血培养标本通常都呈阳性。创伤弧菌也可引起严重的伤口感染，这通常发生于皮肤破损且接触海洋动物或海水环境后[33]。伤口感染可能发展为具有广泛坏死的蜂窝织炎(通常需要手术清创)、肌炎和可能类似气性坏疽的坏死性筋膜炎，以及继发性脓毒症。伤口感染的病死率为 20%～30%。创伤弧菌有 3 种生物群[33]。在美国，大部分感染与生物群 1 有关；生物群 2 主要分离自患病的鳗鱼，也曾从 1 例伤口感染的患者中分离到。创伤弧菌生物群 3 于 1999 年被发现，局限于以色列患者伤口感染和血源性疾病，患者均与养殖的活罗非鱼有接触史[33]。

(五)溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)

溶藻弧菌在海洋生态系统中非常常见，是美国第 2 位最常分离的弧菌。根据美国 CDC 霍乱和其他弧菌疾病监测系统收集的数据，最常分离自与海水接触过的耳和伤口感染标本。一例女性患者在不列颠群岛海浴时，用未消毒的海藻覆盖伤口，后被诊断为溶藻弧菌感染[35]。溶藻弧菌也可分离自眼部感染，较少引起菌血症，绝大多数为免疫力低下患者，可以是单一或多种微生物混合

感染[36,37]。偶尔会从腹泻粪便中分离出该菌[38]，但尚无证据证明它会引起腹泻。

(六)美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damselae*)

美人鱼发光杆菌[以前叫美人鱼弧菌(*V. damsela*)]是一种可严重危及生命的侵袭性病原菌。美人鱼发光杆菌的致死率目前未知，但在很多文献中报道的都是死亡病例，表明其引起的病死率相当高[39]。与该细菌相关的疾病包括软组织感染(蜂窝织炎和坏死性筋膜炎)和菌血症。初诊时，大部分伤口感染无疼痛症状，因而不会考虑到弧菌感染，但数小时内能进展为严重疾病。除了使用抗生素，也常需要进行医疗干预，包括冲洗、筋膜切开术、清创，有时甚至是截肢。

典型的美人鱼发光杆菌伤口感染常发生于渔民，由鱼鳍、鱼钩或鱼叉造成的通透伤导致[39-41]。然而，最近也报道了其他原因导致该菌的感染/定植，包括1名健康少年因手被冲浪板割伤而导致蜂窝织炎；1名孕妇发生尿路感染，伴有尿频、排尿困难，她在感染前1周在加勒比海有过性行为[42-43]。

(七)河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)和弗尼斯弧菌(*Vibrio furnissii*)

河流弧菌在世界各地引起散发的腹泻病例，有时也会引起严重的胃肠炎，并发菌血症[44]。2002—2009年，在印度加尔各答1.1%的腹泻患者中发现了河流弧菌，但只有33%的患者河流弧菌是唯一的病原体[45]。根据公开的报道，河流弧菌引起的肠道外感染较少，但发病率有增加趋势。这些感染包括并发脑炎和菌血症的急性软组织感染(蜂窝织炎)[46-47]。对于许多这样的系统性感染，在感染初期并没有考虑到弧菌，部分预后不良。这些病例最终证实都与摄入海鲜或暴露于海水有关。弗尼斯弧菌很少分离自人类临床标本，如果有分离，则大多来自腹泻患者的粪便[48]。其因果作用尚未得到证实，但值得研究。最近报道了1例因摄入海鲜引起的弗尼斯弧菌菌血症[49]。

(八)其他弧菌和弧菌样微生物

哈氏弧菌(*Vibrio harveyi*)是海生鱼类和无脊椎动物的重要病原菌。迄今为止只报道了4例哈氏弧菌引起的人类感染，包括2个最近的伤口感染，其中一个是美人鱼发光杆菌和哈氏弧菌的混合感染[50,51]。有一项回顾性研究通过利用*rpoB*基因测序确定了2株血和胆囊来源的分离株(病史未知)[52]。霍利格里蒙特菌(*G. hollisae*)[以前称为霍氏弧菌(*Vibrio hollisae*)]是一种嗜盐性弧菌样菌种，主要与中度或重度腹泻有关，有时也会引起菌血症或低血容量性休克[53]。大多数病例有海鲜食用史，如食用牡蛎。梅契尼可夫弧菌(*V. metschnikovii*)常从淡水、咸水和海水中分离到。首次的报道是1例胆囊炎患者感染该菌引起腹膜炎和菌血症。随后又有其他菌血症患者的报道，伤口感染很少见，引起胆囊炎、腹泻和肺炎的病例也有报道[54-55]。辛辛那提弧菌(*Vibrio cincinnatiensis*)首次报道是从1例菌血症和脑膜炎患者中检出，随后在1例腹泻患者的粪便、2例流产的牛胎分离到该菌[56]。2016年，华盛顿州卫生部证实了它的第1例致死病例，从1例进展迅速的蜂窝织炎、菌血症和感染性休克患者的血液中分离到该菌。美国CDC的数据显示，还有3种弧菌偶尔从人类临床标本分离到，其中一个菌种为外来弧菌[57]，与霍乱弧菌关系密切，蔗糖阳性，不嗜盐。另一种是纳瓦拉弧菌(*Vibrio navarrensis*)，有嗜盐性，最初分离自污水[58]。美国CDC利用*rpoA*基因测序和系统进化树分析方法[59]，从自1983年以来从人类标本中收集的菌株中鉴定出15株纳瓦拉弧菌[60]。最近报道了*Vibrio cidicii*，它是一种与纳瓦拉弧菌密切相关的菌种[61]。像纳瓦拉弧菌一样，*V. cidicii*可从淡水、腹泻及肠外感染患者中分离到，但其致病机制尚需进一步研究。

四、标本的采集、运输和储存

相关病史(若已知)需要和标本一起提交给实验室，以便他们在处理粪便时选择适合弧菌科细菌生长的分离培养基；这对不常分离出弧菌的地区尤为重要[62]。有用的信息包括：旅行史，生贝类和其他海产品的食用史，与海水或咸水相关的活动(或伤口暴露于此类环境)，以及与养鱼相关的爱好。

弧菌科细菌对干燥敏感，所以若粪便标本不能在2～4 h内及时接种到培养基上，则需放在运送培养基中。卡-巴运输培养基(Cary-Blair)或其他非抑制性运送培养基适用于弧菌。对于现场采

集的标本，如果需要的话，液态粪便可置于吸水纸或纱布，放入密闭的塑料袋，塑料袋内滴几滴生理盐水以保持水分，然后送到实验室。关于弧菌标本采集和运输的详细信息获得很方便[63]。针对弧菌培养的肠道外标本(血、伤口等)并不需要特殊的收集和处理方法，因为这些部位分离的弧菌都是纯培养，通常情况下初始培养基的盐浓度足以支持弧菌生长。然而分离后传代培养就需添加盐以满足嗜盐性弧菌的生长。在体外，即使是在室温下的潮湿环境中，弧菌科细菌也可能在数周内死亡，所以应按第 12 章描述的用含 15%甘油的胰酶大豆肉汤于−70℃储存。

五、直接检查

常规不推荐用显微镜直接检测粪便中的弧菌，因为它可能无法将致病性弧菌与其他肠道微生物群进行区分。

(一)粪便中 O1 群霍乱弧菌的直接检测

一般通常只有在霍乱流行地区的实验室，或在野外不能进行实验室检查而需要做快速诊断时，才从粪便中直接检测霍乱弧菌。其中最古老的方法之一就是显微镜制动试验，加入 O1 抗体使霍乱弧菌 O1 群失去动力，以及用 O139 抗体检测霍乱弧菌 O139 群。2 种膜抗原快速检测试剂，即 Smart Cholera O1 (敏感性 83%，特异性 88%)和 Bengal Smart O139(敏感性 100%，特异性 97%)，可以从马里兰州哥伦比亚新视野诊断公司(New Horizons Diagnostics Corp., Columbia, MD)购买。用来检测粪便中霍乱弧菌 O1 或 O139 抗原的 2 种快速免疫层析检测试纸条可购自 Span Diagnostics(苏拉特，印度)和 Standard Diagnostics (京畿道，韩国)。Span Crystal Vc 对 O1 和 O139 的敏感性为 92%，特异性为 73%[64]。SD Bioline Cholera Ag O1/O139 试验(Alere 公司，沃尔瑟姆，马萨诸塞州)制造商宣称对 O1 和 O139 抗原的敏感性分别为 95.4%和 99.2%，特异性分别为 94.1%和 98.0%。

(二)临床标本分子检测

20 世纪 90 年代以来的文献就可以找到关于粪便中霍乱弧菌、副溶血弧菌和创伤弧菌分子生物学检测的方法，已经不胜枚举，但很少用于商品化。相对于培养的方法，以 PCR 为基础的技术可以针对弧菌属，同时还可以对冻存的粪便标本进行流行病学研究。此外，对于那些极少分离出弧菌、实验室经验或资源有限的地区，分子生物学检测方法可能更可靠且可以缩短报告时间。粪便中的抑制剂可能影响 PCR 分析的敏感性，但可通过稀释样本来克服。目前可以使用多重 PCR 方法来检测霍乱弧菌的核酸，引物中包括 *ctxA* 基因、*rfb* 基因(O1 和 O139 抗原，可以区分血清型)和 *tcpA* 基因(针对埃尔托型生物型和古典生物型，对流行病学很有用)[65,66]。对副溶血弧菌临床分离株，耐热直接溶血素是主要的毒力因子，也是常用的检测靶位，但它不一定在所有人类感染分离株中都存在[67,68]。在霍乱弧菌很少分离的地区或非沿海地区(副溶血弧菌也很少分离)，与使用碱性蛋白胨水和 TCBS 培养基相比，采用 PCR 方法是不切实际的，且成本高。市售的多重胃肠道感染检测组合可检测粪便中的弧菌。值得关注的是，在这些检测组合中可以检测和区分的弧菌菌种(霍乱弧菌、副溶血弧菌和创伤弧菌)有所不同(表 43-3)。由于弧菌属并不常见，这些组合检测弧菌的性能公开数据通常是有限的。另外，在产品说明中介绍多重组合弧菌靶标检测其他弧菌菌种的变异性，其特异性仍需要进一步评估。美国 CDC 使用加标粪便样本的等分试样对 BioFire FilmArray 胃肠道感染检测组合的性能进行了评估，粪便样本中所测试的目标菌培养为阴性。每个等分试样都掺有一种不同的特征明确的测试菌。这项研究的弧菌属检测组合包括了 13 种不同菌种的 64 株分离株。作为该研究的一部分，总共测试了 27 株霍乱弧菌，阳性率为 96%(26/27)。未检测到的是一株非 O1、非 O139 群菌株。霍乱弧菌的特异性为 100%，因为在霍乱弧菌中未观察到假阳性，即使其中有霍乱弧菌的两个近亲，拟态弧菌和外来弧菌(每种各 5 株)。所有的创伤弧菌(8 株)和副溶血弧菌(7 株)均被检出为弧菌。在测试的 64 株弧菌中，有 5 株检出了假阴性(约 8%)。这项研究正在进行中，详细结果将在其他地方发表(美国 CDC，未发表的数据)。

表 43-3 商用多重胃肠道组合检测弧菌种类和基因靶标信息[a,b]

多重胃肠道芯片	可检测的弧菌菌种	弧菌基因靶	备注
Luminex GPP xTAG	霍乱弧菌	霍乱毒素(*ctx*)	只检测表达(CTX)的菌株
Verigene 肠道病原体(纳米球)	"弧菌群"(霍乱弧菌、副溶血性弧菌)	(*rfbL*),(*trkH*),(*tnaA*)	无法区分菌种
BD MAX 扩展肠道细菌板	"弧菌"(霍乱弧菌、创伤弧菌、副溶血性弧菌)	未提供	无法区分菌种
FilmArray 胃肠芯片(Biofire)	"弧菌"(霍乱弧菌、创伤弧菌、副溶血性弧菌)	(*gyrB*)	弧菌靶标不能区分物种;对所列三个物种不具特异性
	"霍乱弧菌"	(*toxR*)	区分霍乱弧菌与其他菌种

注:[a] 从可用产品包装插页和提供的 510(K)数据获得的信息;[b] Prodesse ProGastro SSCS(Hologic)无法检测到弧菌

六、分离程序

分离与人类疾病相关的弧菌科细菌可以采用常规的肠道培养基,但使用专门的培养基可以提高分离率。在麦康凯或 SS 琼脂平板上,弧菌(创伤弧菌快速乳糖发酵菌株除外)呈无色菌落,部分霍乱弧菌菌株在麦康凯或 SS 琼脂上生长受抑制。在含蔗糖的培养基如 Hektoen 琼脂和木糖-赖氨酸-脱氧胆酸盐(XLD)培养基上,与人类疾病有关的蔗糖阳性的弧菌如霍乱弧菌、河流弧菌、溶藻弧菌和部分创伤弧菌菌株,不能与其他快速发酵蔗糖的肠道细菌区分。加种一块血琼脂平板用于氧化酶试验,可以提高弧菌、气单胞菌和类志贺邻单胞菌的分离率。霍利格里蒙特菌在肠道分离培养基(包括 TCBS 培养基)上都生长不良或不生长,血平板可能是最可靠的分离培养基。

TCBS 琼脂专门用于分离弧菌[1]。干粉制剂和成品平板很容易从大量的商业机构处获得。加入蔗糖可以对弧菌进行初步鉴别,霍乱弧菌、外来弧菌、河流弧菌和溶藻弧菌菌落为黄色,而副溶血弧菌、拟态弧菌和大部分创伤弧菌菌落为绿色(不发酵蔗糖)。但需要注意,如果孵育超过 24 h 才去观察或孵育后冷藏,平板上的黄色菌落可能会转变为绿色。直接取生长在 TCBS 培养基的菌落做氧化酶试验是不可靠的,应采用不含糖的培养基,如血琼脂或营养琼脂上的菌落来做氧化酶试验。

弧菌显色培养基(CHROMagar Vibrio)(CHROMagar Microbiology,巴黎,法国)主要用于从海鲜中分离副溶血弧菌,也可以分离其他弧菌[69]。弧菌在该培养基上菌落颜色可从奶白到淡蓝色到紫色,其他肠道细菌除了奇异变形杆菌和雷氏普鲁威登菌(菌落也为奶白色)通常不生长。海洋琼脂(marine agar)(BD 生物科技公司,斯帕克斯,马里兰州)不含任何抑制性或选择性成分,但含盐量高,可能更适合分离环境中的弧菌,尤其是嗜盐性弧菌。

弧菌纯培养在任何培养基上通常都有多种(多达 5 种)不同的菌落形态,但在非选择性培养基如血琼脂和心浸出液琼脂中最容易观察到。菌落形态包括光滑、粗糙、凸起、扁平、扩散或密集生长,形态多样。在不含碳水化合物的培养基上,霍乱弧菌菌落偶尔会呈皱褶状(特别皱)[70],和光滑型菌落一样对人类有致病性[71]。菌落粗糙度由一种独特的胞外多糖产物决定,可促进生物膜的形成并能抵抗氯、酸性 pH 环境和血清的杀伤作用[70-71]。虽然它被认为可以促进细菌在水生环境中存活,但迄今为止只是体外试验证实。虽然霍乱弧菌古典生物型菌株也有编码该表型的 *vps*(合成弧菌多糖)基因簇,但皱褶型菌落变异株只出现在埃尔托生物型[71]。

急性腹泻患者的粪便通常不需要增菌,如需要增菌,对人体标本最常用的增菌液是碱性蛋白胨水(1%氯化钠,pH 8.5),36℃孵育,6 h 和 18 h 后转种到 TCBS 培养基继续培养。

七、鉴定

(一)常规表型检测(conventional phenotypic tests)

区分弧菌科和肠杆菌科(包括类志贺邻单胞

菌)、气单胞菌科的表型特性见表 43-1，12 种可分离自人类临床标本的菌种表型特征见表 43-2。许多商品化的标准生化管中都有足够的盐(0.5%～1%)供细菌生长，无需再额外补充盐，但是部分生化反应如 Voges-Proskauer 试验、Moeller 试验(用于检测脱羧酶和双水解酶)和硝酸盐肉汤试验不含氯化钠或浓度不足以支持部分嗜盐菌株的生长，所以这些试验的培养基需添加氯化钠(终浓度为 1%)。

需要注意的是，分离自孟加拉国及周边地区的很多霍乱弧菌 O1 菌株和所有霍乱弧菌 O139 菌株对 10 μg 和 150 μg 弧菌抑制剂 O/129 纸片(Remel，Lenexa，KS)耐药，该试验曾用来区分弧菌(表 43-1)。在霍乱不常见的地区，须做完整的表型试验，所有鉴定为霍乱弧菌的培养物均需送到公共卫生实验室做进一步的鉴定，包括 O1 和 O139 凝集和核酸扩增检测 *ctxA* 和 *tcpA* 基因（或从基因组序列中对其检测）。埃尔托生物型可以通过一系列表型试验来区分，包括绵羊红细胞溶血试验阳性、产生乙酰甲基甲醇（Voges-Proskauer 试验）和多黏菌素 B 耐药[13]。除血清群和 O/129 反应不同外，霍乱弧菌 O139 型的表型特征均与霍乱弧菌 O1 埃尔托生物型类似。霍乱弧菌菌株中如果 O1 或 O139 都不凝集，则报告为非 O1 群霍乱弧菌。只有很少的参考实验室可做非 O1 群菌株的血清学分型，通常只用到许多可疑血清型中的部分血清。霍乱弧菌、外来弧菌和拟态弧菌能在无盐培养基上生长(Difco，BD 生物科技公司；是唯一能准确确定是否需要氯化钠的肉汤)，可与其他弧菌菌种区分。副溶血弧菌、溶藻弧菌和美人鱼发光杆菌菌株尿素可以阳性。大部分分离自人类的弧菌产浅黄色或棕褐色色素，但副溶血弧菌可产深棕色色素。霍利格里蒙特菌通常生长不良，尤其在 Moeller 脱羧酶和双水解酶肉汤中，即使补充了盐后也生长不良。如果要做纸片法药敏试验，会产生非常大的抑菌圈，需要用两块平板。梅契尼可夫弧菌特征明显，因为氧化酶和硝酸盐还原试验均阴性。河流弧菌和弗尼斯弧菌易与豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)混淆，尤其是那些弱嗜盐且对 O/129 中度敏感的菌株，因为部分豚鼠气单胞菌菌株可在 TCBS 琼脂上生长。分离自人类标本的弧菌中只有弗尼斯弧菌分解 D-葡糖糖产气。因为创伤弧菌感染病死率高，快速、准确的鉴定很关键。部分创伤弧菌菌株蔗糖阳性，可能会增加鉴定的困难。除了鸟氨酸和赖氨酸脱羧酶试验阴性外，纳瓦拉弧菌和 *V. cidicii* 的表型特征与创伤弧菌都相似[60]。可以通过 *V. cidicii* 利用 L-鼠李糖将其与纳瓦拉弧菌区别[61]。

(二) 商品化系统(commercial systems)

最近没有研究对商品化系统鉴定本章节中细菌的能力进行评估，这些商品化系统的鉴定能力尚存在问题。商品化系统不断地改变和更新它们的数据库，故敦促读者参考当前关于数据库状态的信息。一项研究比较了 6 个商品化系统对各自数据库中的细菌的鉴定结果，发现 API 20E(生物梅里埃公司，北卡罗来纳州达勒姆)、Crystal E/NF(BD 生物科技公司)、MicroScan Neg ID 2 型和 3 型(西门子医疗系统，加利福尼亚州西萨克拉门托)、Vitek GNI＋和 ID-GNB 卡(生物梅里埃公司)将这些细菌鉴定到种的准确率只有 63%～81%[72]。3 种临床标本中最常见的弧菌鉴定准确率各自不同，对霍乱弧菌，鉴定准确率 API 20E 最低(50%)，Crystal E/NF 最高(97%)；对副溶血弧菌的鉴定准确率最低的是 Rapid Neg ID3(40%)，最高的是 API 20E 和 GNI＋(都是 97%)；而对创伤弧菌生物群 1 菌株，GNI＋准确率最低（50%)，Crystal E/NF 最高(97%)。对霍乱弧菌或创伤弧菌只有 Crystal E/NF 的鉴定准确率≥90%，对副溶血弧菌只有 API 20E 和 2 种 Vitek 卡鉴定准确率≥90%。在另一项只针对创伤弧菌生物群 3 菌株的研究中，对 51 株已明确的细菌，MicroScan (98%)和 Phoenix(90%) 系统鉴定准确率最佳，而 Vitek 的鉴定准确率不太满意(13.7%)[71]。Croci 等[73]发现鉴定副溶血弧菌，API 20NE 比 API 20E 敏感性高(20/27 *vs.* 16/27)，但 API 20E 特异性较高(100% *vs.* 82%)。另一项关于 111 株从临床和环境中分离的创伤弧菌研究发现，API 20E、API 20NE 和 Biolog (Biolog 公司，加利福尼亚州海沃德）鉴定准确率分别为 60%、0 和 85%[74]。在检测嗜盐弧菌前，应仔细检查厂商的说明以确定是否要补充氧化钠。最近的一篇报道表明，若用 2.0%氯化钠替代 0.85% 氯化钠作为稀释液，API 20E 鉴定副溶血弧菌临床分离株易得到错误的结果[73]。

(三)分子方法(molecular methods)

分子生物学鉴定方法广泛用于弧菌的调查和研究。然而在临床实验室用于常规鉴定还不多，因为在非沿海地区或霍乱非流行区弧菌是相对少见的病原体。仅用16S rRNA基因测序技术鉴定弧菌科细菌还不是很理想，因为其种间序列差异小，且16S rRNA基因多态性又很常见[75]。Tarr等[52]开发了一种多重PCR技术，设计针对霍乱弧菌*sodB*、拟态弧菌*sodB*、副溶血弧菌*flaE*和创伤弧菌*hsp*基因的引物，准确鉴定了109株细菌，同时还发现4株副溶血弧菌有3株以前没有鉴定到种，1株以前被错误鉴定为溶藻弧菌。此外，应用*rpoB*基因测序技术对15株通过表型方法不能鉴定到种的弧菌进行鉴定，其中12株能准确鉴定到种。使用*rpoA*、*recA*和*pyrH*基因多位点序列分析也可将弧菌分为不同的群，这些群与已建立的分类法大致一致[59]。通过系统发育分析[76]或基因型分析(如平均核苷酸一致性)[77]和数字DNA-DNA杂交[78]从基因组序列评估遗传相关性的方法，可能会在不久的将来取代传统的方法来鉴定菌种。当将其与管家基因的多位点序列分析(multilocus sequence typing，MLST)或单核苷酸多态性的系统发育分析相结合使用时，基因组测序还可以使细菌分离株的鉴定和表型达到亚型水平，这对通过单个工作流程调查暴发很有用[79]。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)有望成为鉴别亲缘关系非常接近菌种的新工具，其测试时间短且成本适中。MALDI-TOF MS对弧菌谱系分类结果可媲美*rpoB*测序方法[80]。一个对VITEK MS v. 2.0(生物梅里埃公司)[81]的多中心评估评估了3个常见的分离菌种(副溶血弧菌、创伤弧菌和霍乱弧菌)，每种菌种分离株的鉴定正确率约90%。对于这3种常见菌种以外的较少见的菌种(如霍利格里蒙特菌)和近亲(如溶藻弧菌、拟态弧菌)，MALDI-TOF MS的性能数据有限。副溶血弧菌和创伤弧菌都在美国FDA批准的Bruker Biotyper CA(Bruker Daltonics，Billerica，MA)和VITEK MS系统的数据库中。然而，也应注意到霍乱弧菌也在美国FDA批准的Vitek MS数据库中，但目前不在Bruker Biotyper的常规数据库中。临床实验室在使用MALDI-TOF MS系统对弧菌进行常规鉴定时应充分考虑其所使用的数据库版本中包括哪些菌种，以及系统内和系统之间(Biotyper与VITEK MS)数据库(科研数据库与FDA批准的数据库)的差异。为了扩展和完善现有的弧菌数据库，需要使用通常从人类标本中常规培养的所有15种菌种的特征明确的临床分离株对MALDI-TOF MS系统进行评估。

(四)霍乱弧菌和副溶血弧菌毒素检测

过去，参考实验室检测霍乱毒素，是通过动物实验中的液体积聚或使用Y1肾上腺或中国仓鼠卵巢细胞观察细胞病变效应。一种反向被动乳胶凝集(VET-RPLA)试验(Denka Seiken)可以同时检测霍乱毒素和大肠埃希菌热不稳定毒素，该方法已商品化。现在更常见的检测方法是使用多重PCR筛选携带*ctxA*基因的菌株[65,66]。大部分人类感染的副溶血弧菌产生由*tdh*和*tdh2x*基因编码的耐热直接溶血素。而环境中的副溶血弧菌分离株很少产生这些毒素，但在非O1群霍乱弧菌、拟态弧菌和霍利格里蒙特菌分离株中可检测到。与霍乱毒素一样，耐热直接溶血素也有商品化的乳胶检测试剂盒(KAP-RPLA；Denka Seiken)，但还没有可以检测副溶血弧菌相关的耐热溶血素(*trh*)的商品化试剂盒。已开发出针对霍乱毒素基因和两种副溶血弧菌溶血素基因的PCR检测方法，但目前还没有商品化[82]。

八、分型系统

(一)血清学分型

血清学分型是一种广泛使用的区分亚型的方法。分型方案已应用于很多菌种，包括霍乱弧菌、副溶血弧菌和创伤弧菌；但是只有霍乱弧菌和副溶血弧菌有商品化分型血清试剂。霍乱弧菌O1(多克隆，稻叶型和小川型)和O139抗血清可购自BD生物科技公司、Denka Seiken、Remel公司和New Horizons公司。副溶血弧菌抗血清可购自Denka Seiken公司(11个O群，9个多价和65个单价K群)。

(二)弧菌的分子分型

用NotI和SfiI酶切的脉冲场凝胶电泳是一种用于监测弧菌标准化的传统分子分型方法[83-84]。对

于创伤弧菌，基因外重复回文序列 PCR(repetitive extragenic palindromic PCR，REP-PCR)是一种有效的亚分型方法[85]。基于多个基因(16S rRNA 基因、*vvhA* 和 *vcg* 基因)核酸序列多态性的基因分型系统最初用于区分临床和环境菌株分离株，但这些方法不能明确区分致病性和非致病性的创伤弧菌[74]。对管家基因的系统发育分析可将创伤弧菌分成两个不同的谱系，环境和临床来源的分离株均可归入各自的谱系[85]。MLST 在解决美国西北部和其他地区的副溶血弧菌菌株的种群结构方面非常有用，该技术可以鉴定大流行性克隆[86]。除了副溶血弧菌外，MLST 方案也可用于其他两个常见的分离菌种(霍乱弧菌和创伤弧菌)(http://www.pubmlst.org)。全基因组测序和传统流行病学标志物的计算机分析已取代了所有这些亚型方法。已经开发了一种用于副溶血弧菌的核心基因组 MLST 方法[86]，该方法可提供暴发调查所要求的分辨率水平。从全基因组测序中提取的单核苷酸多态性的系统发育分析。从霍乱弧菌的全基因组测序中提取的单核苷酸多态性的系统进化分析表明，自 1970 年以来，至少有 11 例霍乱弧菌 O1 从亚洲传入非洲，导致流行持续了 28 年[87]。类似的基因组分析也表明了海地霍乱流行是由一次外部来源(很可能是尼泊尔)传入造成的[88-89]。

九、血清学试验

霍乱弧菌血清学诊断试剂通常只可在专门的参考实验室获得，但急性和恢复期的血清滴度在凝集、杀菌试验或抗毒素测定试验中被认为是可靠的[90]。

十、抗菌药物敏感性

一般来说，对大部分霍乱弧菌和副溶血弧菌引起的胃肠感染，推荐补液治疗优于抗菌治疗，还可以减少抗生素耐药风险。然而，抗菌治疗可以缩短腹泻持续时间和微生物滞留时间，并减少恢复所需要的补液量，而且患者通常在培养结果出来之前就得到治疗[21]。由于霍乱引起的脱水可导致数小时内死亡，因此，必须根据已知的流行菌株的耐药率来选择抗生素[91]。临床和实验室标准协会(CLSI) M45(第 3 版)文件[92]包括非霍乱弧菌的药敏试验指南；针对霍乱弧菌，CLSI 解释指南局限于氨苄西林、四环素类、叶酸途径抑制剂和氯霉素。一个称为 SXT 的整合性接合元件携带磺胺甲噁唑、甲氧苄啶、氯霉素和链霉素耐药基因，最早发现于印度分离的霍乱弧菌 O139 群菌株，现在也可见于 O1、非 O1 与 O139 群霍乱菌株和河流弧菌[93]。自 2005 年以来，亚洲和非洲的大多数霍乱弧菌暴发分离株对复方磺胺甲噁唑和萘啶酸耐药[91]。Ahmed 等[93]曾报道 1 株河流弧菌携带 SXT 元件及一种新的编码庆大霉素耐药的氨基糖苷类乙酰转移酶基因，该菌株对氨苄西林、呋喃唑酮和萘啶酸也耐药。从印度分离的河流弧菌也提及了存在部分多重耐药菌[45]。除氨苄西林外，非霍乱弧菌通常对大多数抗菌药物均无耐药性：2014 年，美国抗菌药物耐药监测系统显示 47.8%的弧菌和 97.6%的溶藻弧菌对氨苄西林耐药[94]。在体外试验单用喹诺酮类或环丙沙星联合头孢噻肟均对创伤弧菌显示出良好的抗菌活性[95-96]。

十一、结果的评价、解释和报告

分离到霍乱弧菌 O1 或 O139 群须立即报告给主治医生，因为霍乱会引起严重的脱水。该病例还应致电当地公共卫生主管部门，并将分离株送到公共卫生实验室进行确认和毒素检测。

当从血液或脑脊液中分离出弧菌时(菌血症和脑膜炎的病死率高)或引起广泛组织损伤的感染性伤口(创伤弧菌和美人鱼发光杆菌)时，结果也需要立即电话告知主治医生，以启动快速、恰当的抗生素治疗。这对创伤弧菌感染特别重要，如果没有快速、恰当的干预，患者的病死率很高。其他标本(尤其是粪便)分离到弧菌(拟态弧菌、溶藻弧菌、霍利格里蒙特菌，哈氏弧菌和梅契尼可夫弧菌)的临床意义可能难以确定，需要及时和主治医生进行沟通、磋商以更好地了解临床情况。大部分医生对许多弧菌科细菌不太了解，所以进行电话沟通对临床医生和实验室技师都是有益的。对医生有用的信息包括是否存在其他病原体和弧菌的相对生长数量(纯培养或几乎纯培养)。弧菌科分离株需上交给公共卫生实验室，因为它们是美国 CDC“霍乱和其他弧菌疾病监测”(COVIS)项目

的管理对象，它们也可能需要进行亚型区分。

已知的可以引起腹泻的弧菌科菌种都应视为有临床意义的，尤其在菌量较大且没有其他潜在病原体存在的情况下。分离于粪便的少量弧菌可能只反映了短暂的定植，但是霍乱弧菌、拟态弧菌和副溶血弧菌等已被证实有毒力因子，能引起肠道感染。有助于确定病原菌致病能力的实验室检查大多只有参考实验室才能做。分离于耳等部位的弧菌科细菌可能存在感染或暂时性定植，或仅仅是暴露于海水后的表现。再次强调，分离到弧菌科细菌需要及时和临床医生进行沟通，以更好地了解临床相关信息，这对指导进一步的实验室检测有帮助。

最后，读者还应注意在文献中弧菌及相近菌种还存在鉴定错误的问题，除非研究者使用的方法对所有弧菌科菌种的鉴别都非常敏感。

参考文献请扫二维码查阅

第44章 假单胞菌属

NIELS HØIBY, OANA CIOFU, THOMAS BJARNSHOLT

（魏莲花 译；刘瑛、王辉 审校）

一、分类

假单胞菌属（*Pseudomonas*）是一大群复杂的、具有重要意义的革兰阴性杆菌，包括来自临床和环境的菌种。大多数菌种属于腐生菌或植物致病菌。由于细菌代谢的多样性，该菌属内大多数菌种可以降解低分子量有机物、芳香族化合物[1]和环境中的污染物。1894年，Migula[2]首次提出了假单胞菌属这一概念，随着菌种鉴定方法学的不断进步，自1966年Stanier[3]等在假单胞菌属分类学上的开创性工作之后，假单胞菌属的分类经历了多次修订；在20世纪70年代初，Palleroni[4]通过rRNA-DNA杂交技术将其分为5个不相关的群。目前，假单胞菌属严格来讲在同源性上属于rRNAⅠ群，为变形菌门γ亚门。Ⅱ群包括伯克霍尔德菌属（*Burkholderia*）和罗尔斯顿菌属（*Ralstonia*）中某些种；Ⅲ群包括丛毛单胞菌属（*Comamonas*）、食酸菌属（*Acidovorax*）、代尔夫特菌属（*Delftia*）和食氢产水菌属（*Hydrogenophaga*）中某些种；Ⅳ群包括短波单胞菌属（*Brevundimonas*）中某些种；Ⅴ群包括窄食单胞菌属（*Stenotrophomonas*）中某些种[1]。假单胞菌属减少到仅剩下属于rRNA同源性Ⅰ群中的菌种，当前列入目录菌种中的12个种与人类临床相关。根据其产生荧光色素的能力将这12个种分为2个不同的群。产荧光群包括铜绿假单胞菌（*P. aeruginosa*）、荧光假单胞菌（*P. fluorescens*）、恶臭假单胞菌（*P. putida*）、威隆假单胞菌（*P. veronii*）、蒙氏假单胞菌（*P. monteilii*）和摩氏假单胞菌（*P. mosseli*），此类细菌可产生黄脓菌素，即一种水溶性的黄绿色或黄棕色色素，在紫外线照射下可产生蓝绿色荧光。很多铜绿假单胞菌也可以产生一种蓝色的绿脓菌素。当黄脓菌素与这种蓝色的吩嗪绿脓菌素结合时，会形成铜绿假单胞菌特征性的亮绿色。这一特征可将铜绿假单胞菌与产荧光群中的其他菌种相鉴别。铜绿假单胞菌也可产生其他一些可溶性色素，如棕褐色色素（棕黑色）及红色色素（红色）。6个不产荧光的种为施氏假单胞菌（*P. stutzeri*）、门多萨假单胞菌（*P. mendocina*）、产碱假单胞菌（*P. alcaligenes*）、假产碱假单胞菌（*P. pseudoalcaligenes*）、浅黄假单胞菌（*P. luteola*）和栖稻假单胞菌（*P. oryzihabitans*）。

假单胞菌属中某些种极具多样性，其栖息范围广泛[4]，该属大多数细菌常常以生物被膜的形式附着在物体表面而使得物体表面黏滑或形成悬浮聚合体[5]。尽管浮游态细菌数量可能非常少，但即使在最低营养环境下，细菌总体数量（生物被膜型和浮游型）仍然非常多。在卫生保健机构中，该菌可见于下水道、淋浴喷头、呼吸机和牙医所用的冷却钻牙设备的水中。

与临床相关的假单胞菌属的一些种具有明显的异质性，并且已被细分为不同生物变种（biovars）或基因变种（genomovas）。各基因变种在遗传学上有所不同，这是菌种命名的依据，但是缺乏特定的表型特征。基因变种由DNA-DNA重组技术、16S rRNA基因测序结合化学分类学总脂肪酸分析及总蛋白质谱型技术确定[6]。很多基因组测序工作正在进行，一些铜绿假单胞菌菌株和其他假单胞菌属的基因组测序工作已经完成（http://www.pseudomonas.com）。

通过多位点酶电泳技术发现，施氏假单胞菌[7]是所有种中最具遗传多样性的菌种。施氏假单胞菌至少有9个基因变种，临床分离株主要是基因变种1和2。目前尚无统一的表型差异可将施氏假单胞菌区分为各自独立的不同菌种[6]。

荧光假单胞菌最初分为生物型 A、B、C、D、E、F 和 G 型(生物型 A 到 E 也被称为生物变种Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ)。生物型 B 被重新划归为边缘假单胞菌(*Pseudomonas marginalis*)。生物型 D 和 E[绿叶假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)和金黄假单胞菌(*Pseudomonas aureofaciens*)]现已归并为单一菌种绿叶假单胞菌,该种不再属于荧光群。

恶臭假单胞菌包括生物变种 A 和 B。生物变种 A 被认为是"典型"的恶臭假单胞菌[8],而生物变种 B 可能与铜绿假单胞菌有密切的亲缘关系。

施氏假单胞菌、荧光假单胞菌和恶臭假单胞菌是植物、海洋、土壤和生物技术等学科的兴趣点,但其临床意义有限。随着多相分类学的不断进步,毫无疑问将会出现更多变化;临床实验室必须紧跟这种变化节奏,以便于把这些菌株和具有临床重要性的假单胞菌属菌种区别开来。

二、菌种描述

基于假单胞菌属在临床微生物学实验室所使用的常规培养基上的生长特性,该属细菌通常被描述为需氧菌,但实际上其中有几个种是兼性需氧菌。它们为无芽胞、直或微弯曲的革兰阴性杆菌,菌体长 1.5～5.0 μm,宽 0.5～1.0 μm,大小和形状取决于其生长阶段。该菌属细菌通常有动力,具有一根或多根单极鞭毛,为需氧呼吸代谢类型,以氧作为终末电子受体。一些菌种如铜绿假单胞菌,可以利用硝酸盐作为替代的电子受体,使其在厌氧环境下也能生长;而一些菌种则可利用精氨酸发酵在厌氧环境下生长[9]。丙酮酸发酵并不能支持铜绿假单胞菌生长,但可使其在厌氧条件下存活[10],并且已证明对小菌落的形成很重要[11]。该特性与致病性相关,这是由于囊性纤维化(cystic fibrosis,CF)患者支气管和鼻旁窦发生慢性感染时,这 2 个部位的痰和黏液标本属于无氧环境[12-14]。大多数具有临床意义的分离株氧化酶阳性(浅黄假单胞菌和栖稻假单胞菌除外)。假单胞菌属中某些种触酶阳性且为化能自养菌。

三、流行病学和传播

(一)内源性与外源性感染

内源性感染通常发生在抗定植能力受到干扰的个体中。这些感染包括中性粒细胞减少宿主胃肠道定植继发菌血症和气管插管个体发生肺炎(呼吸机相关性肺炎)[15]。尽管多个囊性纤维化中心证实了患者间的传播(见下文),但是外源性感染仍可能发生于囊性纤维化患者,其证据是这些患者初始感染分离菌株通常与环境中的细菌形态相类似。铜绿假单胞菌引起的大多数感染可能都是获得性的,如外耳炎、毛囊炎、慢性伤口感染和糖尿病患者的足部骨髓炎。

(二)暴露于非生物贮藏库

尽管临床医生在预防铜绿假单胞菌定植方面做了很多努力,但尚无任何措施证实这些努力持续有效。严格的感染控制程序和强制性的手部卫生习惯是防止患者间传播的最有效措施——当铜绿假单胞菌感染的 CF 患者离开医院病房时,应采取呼吸道(飞沫)预防措施,以防止通过空气传播至其他患者,或被其他疑诊或确诊铜绿假单胞菌肺部感染者传染。来自 CF 患者的铜绿假单胞菌对医院工作人员或健康家庭成员无感染风险(CF 基金会关于囊性纤维化的预防和控制指南,2013 年更新;http://www.cff.org)。

(三)囊性纤维化患者的特殊流行病学因素

在囊性纤维化患者中,铜绿假单胞菌是最主要的呼吸道致病菌[16]。一些研究表明,在同一中心接受治疗的特定患者群体中存在相同的克隆株[17-18],最可能的解释是患者间的传播。大多数患者在感染过程中往往携带一株独一无二的菌株,故一种假定是感染可能来自某个污染的环境源或其他囊性纤维化患者。有证据显示,鼻旁窦是肺部感染的原发灶[19-20]。在囊性纤维化慢性呼吸道感染中,对分离自患者的铜绿假单胞菌菌株的分析显示在每一例患者分离的多个同源菌株中,携带 DNA 错配修复系统缺陷高突变株的流行率非常高[21]。

(四)除铜绿假单胞菌之外的其他假单胞菌

除铜绿假单胞菌之外的其他假单胞菌属菌种通常来自环境。有些菌种(荧光假单胞菌和丁香假单胞菌),也包括一些伯克霍尔德菌属菌种,用作生物防治制剂来抵御经土壤传播的农作物病害[22-23]。

四、临床意义

(一)正常宿主对铜绿假单胞菌的防御

多形核中性粒细胞[24]是对抗侵袭性、系统性铜绿假单胞菌感染最重要的防御力量。具有完整宿主防御能力的个体无铜绿假单胞菌严重感染的风险,且该菌很少定植于此类人群的咽部、肠道和皮肤,但那些在水中长时间游泳和潜水者的外耳和皮肤则是例外。当铜绿假单胞菌从正常无菌部位如血液、胸腔积液或关节腔检出时,一般认为它可引起真正的感染。然而,如果患者病情不严重,也无进一步感染的风险,则应考虑为假性感染。假性感染源调查应包括对用于静脉穿刺或类似手术前皮肤准备的消毒剂进行培养检测。

铜绿假单胞菌能定植在伤口和黏膜表面,例如接受重症监护和使用广谱抗生素治疗的患者口咽部。铜绿假单胞菌还可在 CF 患者的肺部和痰中及慢性创面下面形成非附着的生物被膜(微菌落=细菌聚集体)。铜绿假单胞菌在接受机械通气患者的气管插管和气道造口处可形成生物被膜。

(二)中性粒细胞减少患者的感染

中性粒细胞减少患者如果中性粒细胞减少持续时间长(≥10 天),则有患侵袭性感染的风险。急性白血病诱导化疗或接受清髓预处理的自体/异体骨髓及外周血干细胞移植的成年患者,感染的风险最高[25-27]。

(三)囊性纤维化患者的感染

铜绿假单胞菌是囊性纤维化患者最主要的呼吸道病原菌,此类患者由于呼吸道中纤毛液体量减少、受损黏膜剥离而导致对吸入微生物的清除延迟[28-29]。感染一旦形成,该菌通常以生物被膜形式持续存在[30],且由于全局调控基因[*mucA*、*algT*(=*algU*)、*rpoN* 和 *lasR*]的突变,细菌会转变为适应性的"慢性 CF 表型"[31],其特点如下:①粗糙型脂多糖(LPS)[32],其中 O 多糖的表达是不完整的,这使得细菌对人血清杀菌效应表现为敏感。②黏液性菌落导致其以生物被膜的形式生长[33],即由 *O*-乙酰化古洛糖醛酸和甘露糖醛酸组成的黏液型胞外多糖的过量产生。③无动力[33],这是因其缺乏鞭毛的正常功能。④各种外毒素的低表达,这是由于群体感应系统中 *lasR* 基因的突变造成的。该基因能调控这些毒力因子,尤其是破坏多形核白细胞的鼠李糖脂和其他胞外物质的产生[21,31,34]。

由于黏液型细菌的胞外多糖具有干扰正常宿主吞噬防御和促进生物被膜形成的能力,故在 CF 肺中,铜绿假单胞菌从非黏液型到黏液型状态的转变通常与肺功能的快速下降和预后不良有关[35]。另一种菌落形式即对抗生素高度耐药的小菌落变异型,也可见于 CF 患者的痰标本中[36]。分离自 CF 患者痰标本的铜绿假单胞菌可具有不同菌落形态(图 44-1)。此外,囊性纤维化患者频繁接受抗菌药物治疗会筛选出耐药菌株[16,37]。在原发性纤毛运动障碍[38]和非 CF 支气管扩张[39]患者的肺部,存在类似的铜绿假单胞菌鼻窦-肺的传播和适应性。

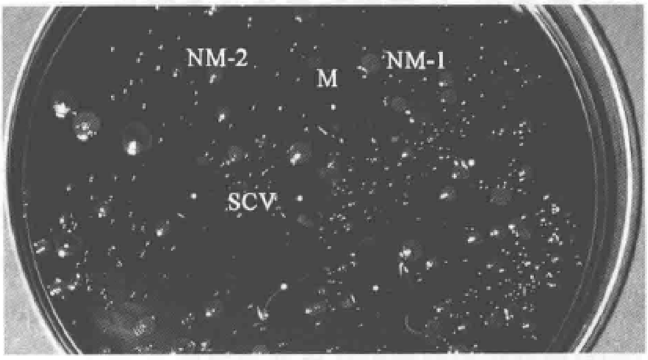


图 44-1 囊性纤维化患者痰中不同菌落形态的铜绿假单胞菌。M. 黏液型;NM-1. 非黏液型菌落 1(深绿色);NM-2. 非黏液型菌落 2(淡绿色);SCV. 小菌落变异型,见彩插

(四)呼吸机相关性肺炎和医疗相关性肺炎

正常呼吸道可以通过呼吸道黏膜纤毛将吸入性的颗粒和潜在的传染病原体清除,从而免遭感染。气管内插管或气管切开等机械通气操作可使上呼吸道的细菌在管道内形成生物被膜,通过吸入进到下呼吸道并在该部位引起感染[40],尤其在广谱抗菌药物治疗过程中或者治疗后。呼吸机相关性肺炎可发生在 10%～30% 的机械通气患者中[41-42]。

(五)烧伤创面感染、慢性伤口感染和糖尿病足感染

皮肤的热灼伤会使其抵御感染的物理屏障完整性受到损害[43],由此导致的损伤组织是营养丰富的培养基,存在铜绿假单胞菌定植和感染的高风

险。该菌可通过初始水疗法播散至伤口创面或其他感染铜绿假单胞菌的患者的交叉感染传播到烧伤创面；此类感染是导致烧伤患者高发病率和高病死率的主要原因之一。局部治疗的目的是预防铜绿假单胞菌和其他病原菌引起的感染。铜绿假单胞菌的烧伤创面感染通常在受伤1周后出现，烧伤程度对感染和预后的风险有着深远的影响。

铜绿假单胞菌能阻止慢性溃疡愈合，常以生物被膜聚合体形式存在于溃疡表面之下[40,44]。检测溃疡中的铜绿假单胞菌需要活检组织标本而不是伤口表面拭子，取多个活检，而不是定量培养，有助于检测伤口中的生物被膜。铜绿假单胞菌是中、重度糖尿病足感染中最常见的革兰阴性杆菌，有时会播散至足骨并引起骨髓炎[45-46]。有关此类感染诊断和治疗指南已经出版[47]。

(六)毛囊炎、外耳炎和感染性角膜炎

铜绿假单胞菌在温度高达42℃时也能存活，故长时间暴露在热水中的人群有罹患感染的倾向。热水浴缸使用者具有患铜绿假单胞菌毛囊炎的风险[48]，对于健康宿主，此感染为自限性的且康复迅速。长时间游泳或潜水者具有罹患外耳感染（“游泳者耳”）的风险，对免疫正常者，这也是自限性的，局部抗菌药物治疗后效果明显[49]。

角膜对感染有一定的抵抗性，除非其完整性受到破坏。角膜接触镜（隐形眼镜）使用者具有罹患铜绿假单胞菌角膜炎的风险，尤其当卫生状况不良和镜片使用周期过长时，感染可能由每天清洁镜片时的污染引起[50]。

(七)铜绿假单胞菌引起的其他感染

铜绿假单胞菌可引起脑膜炎（通常在创伤或外科术后）、耳软骨遭到侵犯的恶性外耳炎[51]、新生儿脓毒症和脑膜炎[52]、静脉吸毒者感染性心内膜炎或骨髓炎[53]、肺部基础疾病患者慢性肺炎[54]，如上所述[40]，患有复杂性尿路异常或脊髓损伤患者的尿路感染[55-56]。上述每一种都不常见，仅在某些正常宿主防御缺失时出现。

(八)除铜绿假单胞菌之外的其他假单胞菌引起的感染

健康人能抵抗由所有假单胞菌属细菌（包括铜绿假单胞菌）引起的严重感染。然而，免疫缺陷的宿主偶尔会被除铜绿假单胞菌外的假单胞属某种细菌所感染，包括（但不限于）荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌、施氏假单胞菌、栖稻假单胞菌、浅黄假单胞菌、产碱假单胞菌、门多萨假单胞菌和威隆假单胞菌。其中的一些菌种已经从囊性纤维化患者的呼吸道分泌物中检测出来，由于它们引起慢性感染罕见，故它们在肺部疾病中的致病机制尚未明确。这些菌种中的一些细菌像铜绿假单胞菌一样，也能在恶劣环境如消毒液中生长，因此导致假性菌血症。然而，由这类物种引起的感染有时也会发生，但由于其毒力较低，这些感染常是医源性的，与被污染的液体、药品、血液制品的使用或留置导管的存在有关[57-61]。

荧光假单胞菌和恶臭假单胞菌能在4℃生长，荧光假单胞菌和其他各种假单胞菌的细菌与假性菌血症的暴发有关[62]。

施氏假单胞菌不是导致人类感染的常见病原菌。它可引起免疫缺陷者的菌血症[63]、HIV患者的脑膜炎[64]、酗酒者的肺炎[65]及骨髓炎[66]。施氏假单胞菌引起的医源性感染包括白内障术后眼内炎[67]、污染的透析液导致的血液透析患者的菌血症[68]。施氏假单胞菌也能从伤口、插管患者的呼吸道和尿路中分离到，尽管该菌在这些疾病中的致病作用尚不清楚[69]。

人们越来越认为栖稻假单胞菌是导致带有中心静脉通路装置的免疫抑制患者菌血症的原因。带有Hickman导管的患者使用的合成沐浴海绵可能是该菌菌血症源头[59]。已有文献报道，这种细菌也能引起慢性腹膜透析患者的腹膜炎、蜂窝织炎、脓肿、伤口感染和神经外科手术后的脑膜炎[57]。

浅黄假单胞菌在罕见情况下会引起人类感染，已有各种不同感染的病例报告，包括菌血症、蜂窝织炎、骨髓炎、腹膜炎、心内膜炎和术后脑膜炎[60,70]。

其他假单胞菌属菌种在人类感染中更为少见。产碱假单胞菌与骨髓移植受体导管相关性心内膜炎有关[71]。

门多萨假单胞菌可从心内膜炎患者中分离出来[72]。已有报道称威隆假单胞菌与肠道炎性假瘤相关[73]。蒙氏假单胞菌已从粪便、胆汁、胎盘、支气管分泌物、胸腔积液和尿中分离到，但其临床意义不明确[74-75]。蒙氏假单胞菌也能从各种标本中分离到[76]，已经有一例蒙氏假单胞菌人工瓣膜心内膜炎的报道[77]。

五、标本的采集、运输和储存

假单胞菌属中的某些种能够在不同的环境和宽泛的温度范围内生存。一些种在孵育温度低于25℃时生长更好，而铜绿假单胞菌在高达42℃的温度中仍能生长。采用标准的采集、转运和保存技术(第19章)很容易从临床标本中获得这些细菌。标本在2～8℃下冷藏至4周后依然能分离到假单胞菌属中的某些种。

六、直接检查

(一)显微镜检查

尽管假单胞菌属中的某些种通常比肠杆菌科细菌更纤细，但从革兰染色形态上区分假单胞菌属中的某些种与其他非发酵杆菌并不容易。在假单胞菌中，不同的细菌在革兰染色菌体形态上有一些变化。恶臭假单胞菌的有些菌株形态可变长，陈旧培养物中的细菌可出现轻度的多形性，鞭毛染色显示一根或多根单极鞭毛。铜绿假单胞菌具有极生单鞭毛(单端极生)，使其具有迥然不同的游泳式运动，在与周生鞭毛的细菌鉴别时具有诊断意义，显微镜下湿片观察标本即可见此现象，如阳性血培养。

黏液型可通过直接检查革兰阴性短杆菌周围是否出现成簇或者长纤维丝进行区分，菌体被浅粉色的染色物质(藻酸盐)所包围(图44-2a～e)。体内形成的生物被膜很小(5～100 μm)，有时亦很少，所以可能难以检测(图44-2)[40,78-79]。此类细菌生长可能非常缓慢，需要培养2～3天[80]，故在直接检查时注意这点非常重要。CF患者肺部或痰内形成的生物被膜中，铜绿假单胞菌的生长速度明显比体外慢，且生物被膜处存在休眠细菌[81]。这种生长缓慢或休眠的细菌几乎不含核糖体，故若使用DNA荧光原位杂交(FISH)或肽核酸(PNA)FISH探针进行诊断，仅产生微弱的荧光[78]。

(二)菌落形态

同时，在培养平板上可观察到黏液型、非黏液型(回复体常常由于*algT*基因的额外突变而发生)和小菌落变异型(图44-1)。它们通常属于同一个克隆株，并表现出对不同的呼吸道微生态环境的适应性[33]。这些黏液型的出现也代表了肺中生物被膜的存在，应该在临床报告中有所体现。虽然游离细菌体外显示敏感，但是生物被膜的形成使黏液型细菌可耐受抗生素治疗。尽管如此，

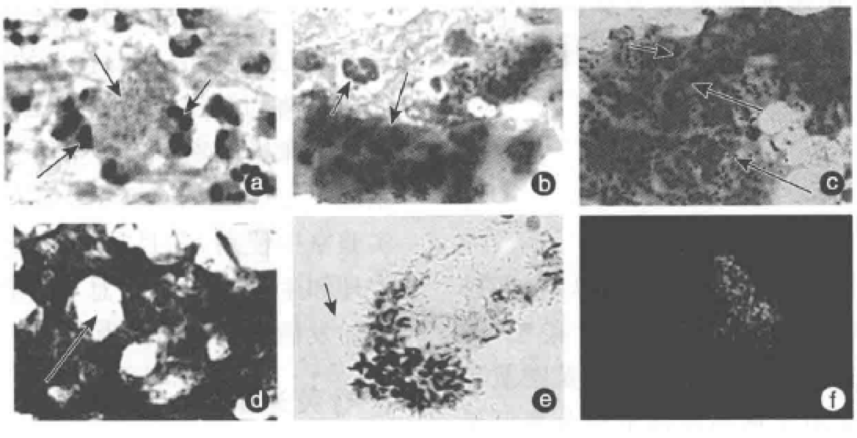


图44-2 痰标本中铜绿假单胞菌生物被膜多样性[30]。通过革兰染色和肽核酸荧光原位杂交技术，检测77例铜绿假单胞菌慢性感染囊性纤维化患者痰标本。标准培养法和铜绿假单胞菌特异性PNA FISH法证实了铜绿假单胞菌的单独存在(f)。检测发现铜绿假单胞菌组织形态的多样性，包括致密生物被膜形成的微菌落(a、b、c和f)(蓝色箭头指向白细胞，黑色箭头指向细菌聚集处)和非黏附的游离细菌(e，箭头)。多形核白细胞的组织形态也呈多样性，这些多形核白细胞围绕着生物被膜(a)、远离生物被膜(b)，而在极少数的情况下会出现在生物被膜内(c)。生物被膜内的小菌落大多数非常致密；然而，有些标本富含"空洞"，类似于某些成熟的体外生物被膜中可见到的充满水的通道(d，箭头指向空洞处)，见彩插

实验室应对不同表型的菌落进行药敏试验并报告给临床医生。因此，如果在标本中检测到生物被膜，那么很可能无法根除细菌，导致抗菌药物治疗后感染持续存在或复发。临床医生可以咨询微生物学家或传染病学专家以优化生物被膜感染的治疗方案[40-41]。其原因是抗菌治疗尽管难以根除细菌，但可减少痰中的 CFU 数量，从而抑制感染的扩散以改善临床状况、维持肺功能[16,40-41,82]。由于假单胞菌属中某些种可能是定植菌，因此分离到该属细菌并不总是与临床疾病有关。然而，它们在中性粒细胞内的出现具有重要的临床意义，若临床医生有需求，应予以镜检[40]。

(三)核酸检测

铜绿假单胞菌和其他假单胞菌属菌种通常采用培养技术进行检测；这些方法对于检测其对抗菌药物的敏感性尤为重要，而该菌天然耐药和获得性耐药水平很高[83-84]。然而，传统的培养技术可以由快速的非培养的方法来补充(而不是取代)，例如 16S rRNA 基因(rDNA)的 PCR 扩增并测序，或用于血液培养分离的 FilmArray 多重 PCR 板，或针对 16S rRNA 基因肽核酸(PNA)荧光探针的荧光原位杂交(FISH)技术(AdvanDx, Woburn, MA)。这些方法可用于快速鉴定组织活检中的革兰阴性杆菌，以评价 CF 患者的痰或血培养标本(不过，使用质谱鉴定方法更快)；也可以对浮游菌或生物被膜形式细菌进行精确定位(图 44-2f)[30,85-92]。

七、分离程序

假单胞菌属细菌营养要求非常简单，在多种标准肉汤和固体培养基上生长良好，如含有 5%羊血的胰蛋白酶大豆琼脂、巧克力琼脂和麦康凯琼脂。推荐这些培养基用于从临床标本中分离假单胞菌属中的某些种。麦康凯琼脂也是一种鉴别培养基，有助于鉴别假单胞菌属中的不同菌株，包括来自 CF 患者的黏液型铜绿假单胞菌菌株。过去，曾使用多种选择性培养基对来自临床和环境样本中的铜绿假单胞菌进行分离和初步鉴定。它们含有的抑制剂包括乙酰胺、呋喃妥因、菲咯啉、9-氯-9[4-(二乙氨基)苯基]-9,10-二氢-10-苯基吖啶盐酸盐(C-390)和西曲溴铵。目前，西曲溴铵和含有 C-390 的邻二氮菲化合物是最常用的选择性试剂。已有报道使用含有西曲溴铵(200 mg/L)和萘啶酸(15 mg/L)的选择性培养基，对 CF 患者痰标本中铜绿假单胞菌的某些菌株有抑制作用。有些菌株是营养缺陷型的，对于来自这些患者的细菌分离，应强调同时使用选择性和非选择性营养培养基的必要性。麦康凯琼脂、马或羊血琼脂及巧克力琼脂对于除铜绿假单胞菌外还可能同时携带其他细菌的 CF 患者的分离效果特别明显，这些菌包括金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌、非结核分枝杆菌(如脓肿分枝杆菌复合群和鸟分枝杆菌复合群)、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*)、伯克霍尔德菌属和曲霉菌属。由于一些分离菌株生长缓慢，培养基应孵育 48～72 h。一些非铜绿的假单胞菌，如荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌和栖稻假单胞菌，在较低温度如 28～30℃可能生长更好。一般孵育 24～48 h 后菌落生长良好。对来自 CF 患者的标本进行培养时，因为慢性感染中的一些菌株生长非常缓慢，如果在 24～48 h 后仍未见生长，推荐将固体培养基在 35～37℃温度下放置 5 天[80]。

八、鉴定

随着基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术的出现，荧光和非荧光假单胞菌的鉴定变得不那么困难，该技术已经在许多临床微生物学实验室取代了传统的表型鉴定系统[93]。然而，传统的鉴定方法仍然在一些小型实验室中使用，并且这种方法也可提供关于细菌生理和生化特征的信息，有时这些信息对研究感染的发病机制仍然很重要。

(一)荧光群

荧光假单胞菌群的细菌产生黄脓菌素，短波长紫外光照射下可激发其产生荧光。金氏培养基 B(King's medium B)有利于黄脓菌素(pyoverdin)的检测[94]。大多数铜绿假单胞菌菌株，除了那些来自患有慢性肺部感染的 CF 患者的菌株，可产生蓝色的绿脓菌素。金氏培养基 A 有利于绿脓菌素的检测，氯仿提取的绿脓菌素呈一种浅蓝色[94]。此群微生物也可产生其他的水溶性色素，

例如绿脓菌红素(红色)或脓褐素(棕黑色)。铁缺乏能提高色素的产量,因为这些色素可作为细菌铁吸收系统的铁载体。不含染料的培养基有利于观察色素的产生。

1. 铜绿假单胞菌 基于铜绿假单胞菌特征性的菌落形态、扩散性色素及葡萄样气味,大多数铜绿假单胞菌在初始分离培养基中容易辨认。培养物也可能散发出玉米饼样的气味,菌落通常扁平、扩散、具有锯齿状边缘和金属光泽,这种光泽通常与菌落的自溶有关[91]。该菌也可出现其他菌落形态,包括光滑、黏液性和侏儒菌落(小菌落变异型)[36,92,95,96](图 44-1)。

铜绿假单胞菌区别于其他临床相关荧光假单胞菌的特点是该菌能在 42℃生长。另外,除产生色素外,氧化酶和精氨酸阳性,三糖铁试验呈斜面碱性/下层无变化也是该菌的鉴别特点,而且它们具有反硝化作用,可以将硝酸盐还原成亚硝酸盐,将亚硝酸盐还原成氮气(在硝酸盐介质中),使其能在体内外厌氧环境中生长(表 44-1)[97,98]。微生物学家必须意识到铜绿假单胞菌表型的某些特定变化。缺乏氧化酶活性的菌株偶有报道,但它们表现出其他的特征。在既往抗生素治疗中使用影响蛋白质合成的药物可能会导致异常表型的出现。来自 CF 患者的铜绿假单胞菌黏液型菌株可能经历几种表型的变化,包括生长缓慢、动力丧失和色素丧失。小菌落变异型可能需要长时间的孵育,无动力,多菌毛、黏附在琼脂表面,在液体培养基中有自动聚集的特性[96]。

表 44-1 临床标本中检出的铜绿假单胞菌菌种的特征[a]

试验	铜绿假单胞菌 (n=201)	荧光假单胞菌 (n=155)	恶臭假单胞菌 (n=16)	威隆假单胞菌 (n=8)	蒙氏假单胞菌 (n=10)	摩氏假单胞菌 (n=12)	施氏假单胞菌 (n=28)	门多萨假单胞菌 (n=4)	假产碱假单胞菌 (n=34)	产碱假单胞菌 (n=26)	浅黄假单胞菌 (n=34)	栖稻假单胞菌 (n=36)
氧化酶	99	97	100	100	100	100	100	100	100	96	0	0
生长												
麦康凯琼脂	100	100	100	ND[c]	ND	ND	100	100	100	96	100	100
西曲溴铵	94	89	81(6)	ND	90	100	4	75(25)	56(18)	15	0	25(28)
6%氯化钠	65	43	100	ND	0	100[e]	80(16)	100	62(6)	41	74	62
42℃	100	0	0	0	0	0	69	100	94	V[f]	94	33
硝酸钠还原	98	19	0	100	0	0	100	100	100	54	62	6
硝酸钠产气	93	3	0	100	0	0	100	100	0	0	0	0
黄脓菌素	65	96	93	100	100	100	0	0	0	0	0	0
绿脓菌素	97[g]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
精氨酸双水解酶	100	97	100	100	100	100	0[d]	100	78	12	100	14
赖氨酸脱羧酶	0	0	0	ND	0	0	0	0	0	0	0	7
鸟氨酸脱羧酶	0	0	0	ND	0	0	0	0	0	0	0	3
水解												
尿素	48(9))	21(3)1)	31(4)4)	25	50	ND	33(22)	50	3(6)	0	26(38)	77
明胶(孵育7天)	82	100	0	13	0	92	0	0	0	0	61	17
乙酰胺	100	6(12)	0	0	0	ND	0	0	ND	ND	ND	ND
七叶苷	0	0	0	ND	0	0	0	0	0	0	100	0
淀粉	0	0	0	ND	0	8	100	0	0	0	0	0
产酸[b]												
葡萄糖	97	100	100	100	100	100	96(4)	100	9	0	100	100

（续 表）

试验	铜绿假单胞菌(n=201)	荧光假单胞菌(n=155)	恶臭假单胞菌(n=16)	威隆假单胞菌(n=8)	蒙氏假单胞菌(n=10)	摩氏假单胞菌(n=12)	施氏假单胞菌(n=28)	门多萨假单胞菌(n=4)	假产碱假单胞菌(n=34)	产碱假单胞菌(n=26)	浅黄假单胞菌(n=34)	栖稻假单胞菌(n=36)
果糖	ND	ND	ND	100	100	100	ND	ND	79(21)	0	ND	ND
木糖	90	100	100	100	0	0	93(7)	75(25)	18(12)	0	100	100
乳糖	<1	24	25(13)	ND	0	0	0	0	0	0	3(24)	14(22)
蔗糖	0	48	0	100	0	17	0	0	0	0	12	25
麦芽糖	<1	2	31	ND	0	17	100	0	0	0	100	97
甘露醇	70	53	25	ND	0	75	89(4)	0	0	0	76(18)	100
西蒙枸橼酸盐	95	93	94(6)	ND	100	100	82(14)	100	26(9)	57(8)	100	97
鞭毛数量	1	>1	>1	1	ND	1	1	1	1	1	>1	1

注：[a] 结果以阳性菌株的百分率显示；括号中的百分率代表迟缓反应的菌株比例。[b] 含 1% 碳水化合物的氧化发酵基础培养基。[c]ND. 无资料。[d] 类施氏假单胞菌细菌（以前的 CDC 3b 群）精氨酸双水解酶阳性。[e]3%～5% 氯化钠生长，但 7%氯化钠不生长。[f]V. 可变；在 41℃下，许多菌株可以生长，见正文中鉴定部分。[g]King 培养基 A[96]

2. 荧光假单胞菌和恶臭假单胞菌 荧光假单胞菌和恶臭假单胞菌不具有特征性的菌落形态或气味。它们不能将硝酸盐还原为氮气，但可分解木糖产酸，这 2 个特点可使两者与其他产荧光的假单胞菌相鉴别。荧光假单胞菌能在 4℃生长和水解明胶，而恶臭假单胞菌并不具有这 2 种能力，该特性可用以区分两者。荧光假单胞菌可能需要孵育 4～7 天才能准确检测其水解明胶的能力。根据 API 20 NE 说明书（版本 7.0；bioMérieux，Inc.，Durham，NC），只有 39%的荧光假单胞菌可在 24～48 h 内水解明胶。

3. 威隆假单胞菌、蒙氏假单胞菌和摩氏假单胞菌 威隆假单胞菌能将硝酸盐还原为氮气，但是不能水解乙酰胺。威隆假单胞菌模式株（LMG17761）不能分解乳糖和麦芽糖产酸，且不能在 36℃生长。蒙氏假单胞菌无法将硝酸盐还原为亚硝酸盐或氮气，水解明胶或分解木糖产酸，这些性质可与荧光群其他菌种相鉴别。摩氏假单胞菌同样不能将硝酸盐还原为亚硝酸盐或者氮气，也不能分解木糖产酸，但是大多数（92%）的分离菌株能水解明胶（表 44-1）。

其他产荧光的假单胞菌很少在临床标本中检出。许多菌株无精氨酸双水解酶活性。在适当的时候，鉴定到“假单胞菌种，而非铜绿假单胞菌”，并对分离菌株进行药物敏感性试验，在大多数情况下足以满足临床需求。必要时，可以将这些分离株送往参考实验室，用 16S rRNA 基因测序进一步鉴定。

(二)非荧光组

1. 施氏假单胞菌和门多萨假单胞菌 大多数施氏假单胞菌在初始分离培养基上呈特殊的干燥、皱缩样菌落形态，类似于类鼻疽伯克霍尔德菌（*Burkholderia pseudomallei*），使其容易辨认。施氏假单胞菌与后者的区别在于缺乏精氨酸双水解酶活性和不能分解乳糖产酸。施氏假单胞菌菌落可凹陷或黏附于平板上，呈浅褐色到棕色。黏附使得菌落在琼脂培养基上难以被移动。由于制作特定浊度的菌悬液存在困难，商品化的药敏检测系统对该菌的测试效果并不理想。不是所有的施氏假单胞菌都能产生皱缩型菌落，此类菌株与其他假单胞菌的鉴别要点是该菌能水解淀粉，这是其独特的生化特性。

门多萨假单胞菌菌落光滑、无皱缩、扁平，可产生棕黄色的色素。该菌的关键性生化特征包括能将硝酸盐还原为氮气、精氨酸双水解酶活性呈阳性及不能水解乙酰胺或淀粉。

2. 产碱假单胞菌和假产碱假单胞菌 产碱假单胞菌和假产碱假单胞菌在临床标本中很少能分离到[71]，且两者均无特征性的菌落形态。相比于其他的假单胞菌，它们的生化反应不活泼。与其他生化反应不活泼的革兰阴性杆菌的区别在于：以上 2 个细菌氧化酶反应阳性，有动力（单极鞭毛）且能在麦康凯琼脂上生长。产碱假单胞菌与假产碱假单胞菌的区别是前者不分解果糖。虽然 42℃生长被认为是区分两者的一个特征，但现

在进一步的研究表明，大多数产碱假单胞菌菌株也能在41℃（可能是42℃）生长。许多商品化系统难以鉴定这些细菌，大多数情况下，它们仅被称为"假单胞菌属中某些种，而非产碱假单胞菌"。如果临床要求提供准确的鉴定结果，建议使用16S rRNA基因测序。

3. 浅黄假单胞菌和栖稻假单胞菌　浅黄假单胞菌和栖稻假单胞菌可以通过氧化酶反应阴性及产生一种细胞内非扩散黄色色素与其他假单胞菌进行鉴别。这两种菌菌落通常呈粗糙、皱缩、黏附性或罕见光滑型菌落。浅黄假单胞菌与栖稻假单胞菌的鉴别点是前者能水解邻硝基苯β-D-吡喃半乳糖苷和七叶苷。

（三）商品化鉴定系统的使用

许多实验室采用商品化鉴定系统而非传统的生化试验鉴定假单胞菌属菌种。商品化产品分为手工和自动化系统。较常用的手工系统是API 20NE（bioMerieux）、Crystal E/NF（Becton Dickinson）和非发酵菌板条RapID NF Plus（Innovative Diagnostic Systems），而OmniLog公司表型芯片系统（Biolog，Inc，USA）可对细菌代谢能力进行全面测定，该系统主要用于研究型实验室。手工系统通常能准确鉴定铜绿假单胞菌，包括黏液型菌株和其他的假单胞菌属菌种，对于来自CF患者的分离株来说，手工鉴定系统优于自动化系统。

自动化系统广泛应用于临床实验室。由于铜绿假单胞菌通过小部分传统的生化试验即能很容易鉴定，故通常不必使用较昂贵的商品化系统。对于非铜绿假单胞菌菌种的鉴定，一些自动化系统并不是很准确，可能需要些附加试验，从而增加人力、物力和时间成本。自动化系统能够鉴定非CF来源的铜绿假单胞菌，其准确率可达90%～100%[99-100]，但是有些系统可能需要一些附加试验才能准确鉴定[101-102]。很多综述聚焦于对铜绿假单胞菌鉴定效果的评价，只有少数讨论了所测试的其他假单胞菌属。当鉴定其他假单胞菌属时，VITEK 2 GN板条（bioMérieux）效果较好[100,103]，而其他系统常常需依赖附加的试验才能完成鉴定[16,101-102,104]。因此，在接受自动化系统鉴定结果之前，应考虑菌落形态、色素、关键的生化和生理特征（如氧化酶试验、42℃生长试验）等。

假单胞菌属细菌的鉴定，尤其对那些从CF患者分离的菌株，使用快速生化系统并不是最佳的选择。根据制造商提供的方法，CF患者中分离的菌株在MicroScan（Dade International，Inc.）系统（Negative Combo 15）中孵育20～24 h，其鉴定结果较差，仅仅有57%的非黏液型和40%的黏液型铜绿假单胞菌菌株能被准确鉴定[105]。而孵育时间延长至48 h，其准确度分别提高到86%和83%。鉴定错误的细菌最常见的是产碱杆菌属（*Alcaligenes* spp.）或荧光假单胞菌/恶臭假单胞菌。有报道称，对于来自非CF患者标本的铜绿假单胞菌，其鉴定总准确率可达94%[105]。其他的自动化系统对于从CF患者分离的菌株的鉴定效果目前还没有专门的评价，因此，建议谨慎解释结果。在大多数情况下，非铜绿假单胞菌作为感染致病菌的重要性尚未确定。目前，除铜绿假单胞菌外，其他菌种若要获得种水平的鉴定结果，通常需进行16S RNA基因测序。

（四）MALDI-TOF MS检测

目前，大多数实验室使用MALDI-TOF MS系统，通过蛋白质分析对临床分离株进行鉴定。MALDI-TOF可用于单菌落的鉴定（直接挑取菌落涂板，或直接涂板加甲酸前处理，或用乙醇和甲酸进行管内蛋白质提取），也可直接用于阳性血培养鉴定[93,106-107]。MALDI-TOF MS比商品化鉴定系统更快速，更经济，对于普通的临床分离株有很好的鉴定能力，但对于少见菌株而言，由于数据库信息不足，下列情况常不能准确鉴定到种，如得分低于推荐的种水平（≥2.0）或属水平（≥1.7且<2.0）[108-110]。众所周知，传统的生化试验也存在类似问题。在这种情况下，推荐进行16S核糖体RNA基因检测，实验室可给出"假单胞菌属，将进行进一步鉴定"的报告。

九、分型系统

（一）表型分型方法

之前，以流行病学为目的而进行的铜绿假单胞菌分型取决于细菌的表型特征，如绿脓菌素、噬菌体、O抗原和鞭毛分型。最广泛使用的方法是用多克隆或者单克隆抗体检测脂多糖中的O-多聚糖的差异（LPS血清分型；约20种O-群）。铜绿假单胞菌产生2种脂多糖：常见的A-带仅由短

链多糖组成,大多数菌株都可以产生此类多糖;而B-带为高分子量且具有型别特异性。CF患者慢性感染期间,脂多糖B-带消失并由A-带取代从而使菌株变成多凝聚性[111]。因此,除了铜绿假单胞菌疫苗有效性的相关研究外,这些表型方法在很大程度上已被基因型方法所取代[112]。

(二)基因型分型方法

过去20年中,已经开发了几种用于流行病学的铜绿假单胞菌基因分型方法[113]。在此将这些方法按开发时间顺序简要描述如下。每一种方法都有其应用价值,甚至可用于CF患者分离株的分型。

1. 限制性片段长度多态性 限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism,RFLP)取决于在细菌基因组内特定部位的遗传多样性。铜绿假单胞菌外毒素A编码基因(*exoA*)上游具有这种多样性。在一个有关不同分型方法的研究中,证实了*exoA* RFLP法优于所有铜绿假单胞菌表型分型方法。这种方法也首次令人信服地证实CF患者通常每次感染都由一种独特的菌株引起,并且持续很长一段时间(不被根除或替换)。菌毛基因的RFLP分析表明,尽管菌毛蛋白的表达有所改变,但CF患者仍被同一菌株持续地感染。RFLP的缺点是其鉴别能力相对较弱(相较于新方法),操作烦琐,且大多数需要使用放射性探针。

2. 核糖体分型 核糖体分型是一种基于rRNA系统发育分析的方法,即通过凝胶电泳分离消化后的基因组DNA,然后采用标记的16S rRNA或23S rRNA探针进行杂交。核糖体分型已用于铜绿假单胞菌,但其分型能力不如脉冲场凝胶电泳[114]。

3. 脉冲场凝胶电泳 脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis,PFGE)一直被认为是细菌分型的金标准,因为该法以全基因组为研究对象。在Tris缓冲液中加入50 μmol/L硫脲可以达到100%的分型效果[115]。它是研究暴发流行的标准方法[116],但将来很可能被全基因组测序(WGS)所取代[117]。每株菌(或克隆株)的PFGE带型是唯一的,且该方法可用于任何细菌种类,系统发育关系可以通过商品化软件以系统树图的形式展示[118]。然而,来自不同机构的暴发株经过不同实验室分析后,其结果的比对是困难的,这是由于PFGE的谱型没有国际的命名规则。

4. 基于PCR的分型方法 几种基于PCR的方法已用于铜绿假单胞菌的分型。这些方法根据基因组内的已知元件或随机但相对频繁出现的编码序列进行分型。后者,即随机扩增多态性DNA分析已证明对铜绿假单胞菌分型能力是非常强大的,但它必须在相同的设备上运行才能产生可重复的结果。来自随机扩增多态性DNA分析的数据常与PFGE的数据高度一致。PCR扩增产物经限制酶酶切后可产生更多可用于鉴别的数据。

5. 多位点可变数目串联重复序列分型 多位点可变数目串联重复序列分型(variable-number tandem repeat,VNTR)是一种基于PCR的分型方法,它依赖于DNA重复序列的某些区域存在固有变异性。针对铜绿假单胞菌和丁香假单胞菌(*P. syringae*),研发了不同标记组合的分型方案。VNTR与PFGE方法的分型结果较为一致,且在某些情况下VNTR还能提供额外信息[119]。

6. 单核苷酸多态性分型 L. Wiehlmann和B. Tümmler(德国汉诺威医学院)开发了基于AT生物芯片(Clon diag Chip Technologies, Germany)的单核苷酸多态性(single-nucleotide polymorphism,SNP)分型技术。这种方法可以同时检测高度保守基因组区域内的13种单核苷酸多态性位点,如*oric*、*cits*、*ampc*、*opri*、*fliC*、*oprL*和*alkB2*。此外,AT芯片还可以检测一些基因岛、致病因子和可变基因,并能对给定分离株的附属基因组库提供一些启示[120]。已经证明这种方法在铜绿假单胞菌引起的CF患者慢性肺部感染的演化和流行病学研究上尤其有用[121-123]。

7. 多位点序列分型 多位点序列分型以7个管家基因(*ascA*、*aroE*、*guaA*、*mutL*、*nuoD*、*ppsA*和*trpE*)的等位变异为基础,已应用于铜绿假单胞菌分型且辨别率与PFGE[112]相符。该法还可用于基于等位基因的聚类技术,如eBURST,它依据共享等位基因数量将分离株定位到克隆复合群中,从而识别主要克隆株,并描绘出该菌种的种群结构[125]。

8. 全基因组测序(WGS) 随着快速的下一代测序的应用,使得WGS的成本更加低廉和快速,其结果对于暴发时的调查具有重要价值,还有助于感染控制。然而,与PFGE相似,WGS的检

测结果尚无统一国际命名法[117,126-128]。在未来几年内，WGS很可能成为首选的分型方法，但前提是：①涉及SNP时，其分型结果是否具有可重复性；②需对分型结果确立国际命名法，以便快速比较不同实验室间的结果。

十、血清学试验

血清学试验可用于鉴别间歇性定植和慢性感染，也可用于评价铜绿假单胞菌感染的CF患者的治疗效果和预后。已发布了几种方法。2个已获批准的商品化试剂盒如下：Pseudomonads-CF-IgG ELISA试剂盒（Statens Serum Institut，Copenhagen，Denmark），可检测超声提取的铜绿假单胞菌17个O群抗原所对应的抗体；抗铜绿假单胞菌的酶免疫法（Mediagnost，Reutlingen，Germany）能检测到针对3种铜绿假单胞菌抗原（碱性磷酸酶、弹性蛋白酶和外毒素A）的血清抗体[129,130-134]。Pseudomonads-CF-IgG ELISA试剂盒经改进后也可检测分泌型的IgA，如检测唾液或黏膜分泌物标本中的IgA以诊断慢性铜绿假单胞菌鼻窦炎[135]。

十一、抗菌药物敏感性

铜绿假单胞菌对多类抗生素天然耐药，它具有通过不同染色体位点突变或水平获得质粒、转座子、整合子所携带的耐药基因而发展为耐药的能力。有关各种耐药机制、底物特异性和地理分布的讨论如下。铜绿假单胞菌获得性耐药的频繁发生限制了抗菌药物敏感谱在流行病学分型上的应用。本文仅对浮游型生长的细菌的耐药机制进行讨论，这是因为生物被膜型生长的铜绿假单胞菌对全身用抗菌药物可达到的浓度在生理学上是耐药的[16]，但对局部用药可能敏感[136]。浮游型生长的细菌药敏检测的常规方法为稀释法或扩散法，这2种方法不可用于生物被膜型生长的细菌，也不能为临床抗生物被膜感染的治疗用药提供任何指导[37]。虽然生物被膜型生长的铜绿假单胞菌对抗生素的耐药性强于浮游型细菌，但是β-内酰胺类、氨基糖苷类、环丙沙星和黏菌素的药代动力学和药效学遵循相同的通用规则[137-138]。然而，铜绿假单胞菌菌株通过去阻遏作用稳定地表达β-内酰胺酶，从而减少β-内酰胺类渗透至生物被膜，此时生物被膜中的β-内酰胺类药物药代动力学/药效学会从时间依赖变为剂量依赖[137]。

某些抗生素对铜绿假单胞菌的杀菌作用需要活性氧的形成[139]，故在无氧条件下其杀菌效果会降低（如喹诺酮类和氨基糖苷类），而其他抗生素即使在厌氧条件下也具有杀菌作用（如多黏菌素）[140]。因此，体内抗菌药物活性取决于感染部位的氧分压。

（一）耐药机制

1. 天然耐药 天然耐药是通过多种机制介导。铜绿假单胞菌产生一种诱导型染色体AmpC型β-内酰胺酶，这种酶使它对氨苄西林、阿莫西林、阿莫西林-克拉维酸、第1代头孢菌素、第2代头孢菌素、头孢噻肟和头孢曲松耐药。虽然抗渗性最初被认为是其他抗菌药物耐药的原因，但目前公认外排泵系统是一种更为普遍的天然耐药机制。

在铜绿假单胞菌中存在着多药外排系统耐药结节分化家族（resistance-nodulation-division family，RND），它能导致β-内酰胺类、氯霉素、氟喹诺酮类、大环内酯类、新生霉素、磺胺类、四环素、甲氧苄啶和氨基糖苷类等抗菌药物的泵出[141]。铜绿假单胞菌对碳青霉烯类药物厄他培南具有天然耐药性，该药物分子结构对外排系统具有高亲和力，且不易通过铜绿假单胞菌的孔蛋白。铜绿假单胞菌的基因组测序表明，很高比例的基因，包括调控基因参与了各种有机化合物的外排，这促使细菌适应不同的环境并对大多数抗菌药物耐药。铜绿假单胞菌的外排系统也可排出毒力因子，增强了它们对宿主的毒性。

很多抗生素能克服铜绿假单胞菌的天然耐药，从而对该种细菌有活性。这些药物包括超广谱青霉素类（如哌拉西林），某些第3、4代头孢菌素类（头孢他啶和头孢吡肟）、头孢菌素与β-内酰胺酶抑制剂复合制剂[头孢他啶/阿维巴坦，头孢洛扎（ceftolozane）/他唑巴坦]，碳青霉烯类（亚胺培南、美罗培南和多尼培南）、单环β-内酰胺类（氨曲南）、氟喹诺酮类（环丙沙星和左氧氟沙星）、氨基糖苷类（庆大霉素、妥布霉素和阿米卡星）和黏菌素。不幸的是，该菌对所有抗假单胞菌抗生素

都可产生突变耐药。

2. 获得性耐药

(1)外排泵:虽然多药外排系统在铜绿假单胞菌的天然耐药中发挥了重要作用,但是它们同时也对多重耐药(MDR)的发生至关重要,因为同一个外排泵的底物可以是不同的抗菌药物。外排系统的高表达常与适应性和毒力的缺失有关。鉴于此,微生物需要确保仅在必要的时候才表达外排泵编码基因,故其表达受到局部和整体调节子的严密调控。MexAB-OprM 外排系统在所有铜绿假单胞菌菌株中均呈组成型表达。阻遏基因 *mexR* 的上调或突变(*nalB* 突变子)导致外排泵过度表达和多种抗生素 MIC 值显著升高,包括喹诺酮类、青霉素、头孢菌素、氨曲南和美罗培南(低水平耐药 MIC,8～32 μg/ml),不包括亚胺培南。分离自囊性纤维化患者的铜绿假单胞菌,其外排泵的上调(MexCD-OprJ 和 MexXY-OprM)分别是喹诺酮类和氨基糖苷类药物耐药的重要决定因素[142-143]。有趣的是,*mexXY* 基因受氧化应激诱导(见下文"适应性耐药"),这种情况见于 CF 患者的肺中[144]。

(2)非渗透性突变:非渗透性突变可导致细菌对碳青霉烯类、氨基糖苷类和喹诺酮类耐药。这是碳青霉烯类药物耐药的重要机制,由 OprD 孔蛋白缺失所致。正常情况下,该蛋白会形成一个狭窄的跨膜通道,允许碳青霉烯类渗透入菌体内。

(3)β-内酰胺类耐药机制:β-内酰胺酶。染色体编码的 AmpC 型 β-内酰胺酶[145]调控机制的突变导致了酶高水平的组成型表达,而使铜绿假单胞菌对脲基青霉素和头孢菌素耐药。与肠杆菌科细菌相比,β-内酰胺酶的获得在铜绿假单胞菌中并不常见[146]。然而,人们对该菌中属于 A 类的超广谱 β-内酰胺酶(ESBL)的关注在增加,同时酶的类型也趋于多样性[147]。这些酶的编码基因位于质粒、转座子或整合子上,这使它们的进一步播散成为可能。此类酶导致了细菌主要对抗假单胞菌青霉素类、头孢他啶、头孢吡肟和氨曲南耐药,但碳青霉烯类药物不在此列(除具有碳青霉烯酶活性的 GES 型 ESBL 外)。除了天然携带 β-内酰胺酶(D 类 β-内酰胺酶) OXA-50 外,有报道发现铜绿假单胞菌还携带一些其他类型的 OXA 酶[147]。

β-内酰胺酶抑制剂,如克拉维酸和他唑巴坦,对铜绿假单胞菌的 ESBL 和 AmpC 头孢菌素酶没有足够的活性[148]。头孢他啶与新型的 β-内酰胺酶抑制剂(阿维巴坦,一种非 β-内酰胺分子)的复合制剂已被证明对铜绿假单胞菌的头孢他啶非敏感菌株和耐美罗培南的菌株均有效[149]。阿维巴坦可抑制多种丝氨酸 β-内酰胺酶,包括 Ambler A 类(ESBL 和 KPC)、C 类(AmpC)和某些 D 类(如 OXA-48)酶,但不包括金属 β-内酰胺酶。

另一种新的抗菌药物组合头孢洛扎/他唑巴坦,是一种新的头孢菌素(头孢洛扎)与一种旧的 β-内酰胺酶抑制剂(他唑巴坦)的复合制剂,具有抗多重耐药铜绿假单胞菌的活性。

铜绿假单胞菌中水解碳青霉烯类的 β-内酰胺酶(碳青霉烯酶)大部分属于 Ambler B 类,通常称为金属酶。金属 β-内酰胺酶(MBL)可水解碳青霉烯类和其他 β-内酰胺类(除了单环 β-内酰胺类,如氨曲南)且不受 β-内酰胺酶抑制剂(如克拉维酸、他唑巴坦或阿维巴坦)所抑制,但易被二价离子螯合剂抑制,如 EDTA。

这些酶的基因是由质粒介导的,并且位于整合子可变区插入的移动基因盒上,从而导致其表达和播散的潜能增强。值得关注的是,这些基因与氨基糖苷类耐药基因毗邻[84]。碳青霉烯酶正在亚洲、欧洲和美洲传播[150-156]。在铜绿假单胞菌中检测到各种不同的碳青霉烯酶家族,如 IMP(亚胺培南酶,1988 年首次报道于日本)、VIM(维罗纳整合素编码的金属 β-内酰胺酶,于 1999 年被发现)、SPM(圣保罗金属 β-内酰胺酶,于 1997 年在巴西分离)、GIM(德国亚胺培南酶,于 2002 年在德国被发现)、NDM(新德里金属 β-内酰胺酶,于 2011 年在塞尔维亚铜绿假单胞菌中首次报道)和 FIM(佛罗伦萨亚胺培南酶型变体,2012 年于铜绿假单胞菌检出)[156]。IMP 和 VIM 是铜绿假单胞菌中最常见的金属碳青霉烯酶,据报道产 NDM-1 酶的铜绿假单胞菌在世界范围内均有检出,包括印度、意大利、埃及、巴勒斯坦地区和斯洛伐克[156,157]。金属 β-内酰胺酶(VIM 和 IMP 型)也可在恶臭假单胞菌、摩氏假单胞菌和蒙氏假单胞菌中检测到。除铜绿假单胞菌以外的其他假单胞菌可能作为转移性 MBL 的贮存库,有助于这些耐药基因的播散[158-159]。

(4)氨基糖苷类药物耐药机制:尽管抗渗性突变可导致氨基糖苷类耐药,尤其在 CF 和重症监护患者中,但在全球范围内,质粒或染色体编码的酶

灭活药物依然是这类抗生素耐药的最常见机制[160]。在铜绿假单胞菌中检测到氨基糖苷修饰酶已有30余年历史，这些酶导致了庆大霉素、妥布霉素和(或)阿米卡星等不同耐药性组合的出现。特别是那些来自欧洲和拉丁美洲的铜绿假单胞菌分离株，它们越来越多地携带多个修饰酶，从而导致了对广谱氨基糖苷类药物的耐药。这些酶基因通常位于转座子和(或)整合子上，后两者同时携带其他抗生素如磺胺类、β-内酰胺类和氯霉素的耐药决定簇。氨基糖苷类修饰酶、超广谱β-内酰胺酶和金属酶相关的多重耐药基因格外令人关注[160]。氨基糖苷修饰酶可以和不渗透性突变同时出现，导致广谱氨基糖苷类耐药。文献报道的位于可移动元件上(质粒和转座子)的16S RNA甲基化酶如ArmA、RmtA、RmtD成为铜绿假单胞菌中一种氨基糖苷类耐药新发机制。甲基化酶可干扰氨基糖苷与细菌靶位的结合，从而产生对阿米卡星、庆大霉素和妥布霉素的临床耐药性[147]。

(5)多黏菌素类耐药机制：在铜绿假单胞菌中，多黏菌素耐药的产生是由于4-氨基-L-阿拉伯糖共价结合于脂多糖的脂质A，从而阻断其主动摄取该抗生素的能力[161-162]。4-氨基-L-阿拉伯糖的合成、跨膜转运和结合所需的酶由*arnBCADT-EF*操纵子编码。至少有5个双组分系统参与该操纵子的调节，即PhoQ、PMRAB、ParRS、CprRS和ColRS。而该操纵子的诱导性、可逆性激活(耐受)依赖于双组分系统，后者可被多黏菌素类激活[163]。

*arn*操纵子的缓慢诱导在生物被膜感染中可能很重要，但在对游离细菌的急性感染可能不具有临床意义。不建议采用纸片扩散法进行黏菌素敏感性试验，因为耐受现象可能导致铜绿假单胞菌在抑菌圈内延迟生长，因此很难确定抑菌圈。这些系统中的突变很重要，可导致*arn*操纵子的过度表达，从而致使黏菌素耐药[162]。最近已证明，质粒携带的基因*mcr*-1、*mcr*-2、*mcr*-3和*mcr*-4可导致在肠杆菌科细菌产生多黏菌素耐药性[164-165]。这类黏菌素的耐药性是由于在细菌的脂质A外膜侧4′端上结合了磷酸乙醇胺，从而导致其与黏菌素的亲和力显著降低。实验条件下，*mcr*-1质粒能在铜绿假单胞菌中转移[166]。虽然尚无携带这些质粒的铜绿假单胞菌临床分离株的报道，但是黏菌素耐药性监测对于发现铜绿假单胞菌中潜在的耐药质粒传播非常重要。2015年，欧洲监测报告显示，所检测的铜绿假单胞菌中0.83%对黏菌素耐药。

(6)喹诺酮类药物耐药机制：DNA促旋酶(*gyrA*、*gyrB*)和(或)拓扑异构酶Ⅳ(*parC*和*parE*)靶基因突变是环丙沙星最常见的耐药机制，所致MIC水平相对较高。外排泵调控因子的突变是另一种耐药机制，可导致MIC水平轻度升高[167]。

在革兰阴性菌中，质粒携带的喹诺酮耐药决定因子(*qnr*)的发现具有重要意义。原因如下：①它已被接合转移到多个微生物，包括铜绿假单胞菌；②与高水平喹诺酮耐药有关(MIC上升至250倍)；③似乎还与携带β-内酰胺和氨基糖苷类耐药决定子的整合子有关；④扩大了质粒介导的高水平喹诺酮类耐药谱。

(7)阿奇霉素耐药机制：阿奇霉素尽管由于渗透性差，在常规药物敏感性试验中无抗假单胞菌作用[168]，但因该药物被认为对稳定期铜绿假单胞菌具有杀菌作用，且具有抗群体感应效应和抗炎效应，所以它被广泛应用于CF患者慢性铜绿假单胞菌肺部感染的治疗[169]。有报道称阿奇霉素核糖体结合位点的突变与其体外抗菌活性降低有关[170-171]。

(二)多重耐药(MDR)

在世界范围内，耐抗菌药物的铜绿假单胞菌，包括MDR[被定义为对3类或3类以上抗菌药物(每类中至少一种)不敏感][172]，在某些地区广泛传播并日益增多，而在另一些地区，该比率则略有下降或保持稳定。根据2015年欧洲抗菌药物耐药性监测报告，12.9%侵袭性铜绿假单胞菌对氟喹诺酮类、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、碳青霉烯类和氨基糖苷类药物中的3类或3类以上药物耐药，5.5%的铜绿假单胞菌对上述五类抗菌药物均耐药。不同国家间多重耐药菌株比例差异很大，从一些国家(冰岛、爱沙尼亚)的0%到其他国家(罗马尼亚)的66%以上。据报道，多重耐药铜绿假单胞菌在南欧和东欧国家广泛流行。根据2014年美国国家医疗安全网关于耐药菌医疗相关感染的报告，14.2%的铜绿假单胞菌为多重耐药表型，美国医学中心通过国际最佳耐药监测计划

网络也发布了类似的数据(15.4%)[149]。美国各地区的耐药报告数据存在一定差异,东南部各州的多重耐药菌株比例有所上升。有关遗传背景的研究显示,多重耐药铜绿假单胞菌同时包含一系列的基因突变,包括高产 AmpC 酶、OprD 失活、氟喹诺酮类高水平耐药的靶基因突变、与外排泵高表达相关的基因突变、携带氨基糖苷类水解酶的 1 类整合子的表达等[173]。然而,若菌株获得耐药性质粒,则有助于进一步获取 ESBL 和 MBL 等基因。从慢性感染的 CF 患者中分离到的菌株大多为突变株,突变率是参考菌株 PAO1 的 20 倍,并且能迅速对抗菌药物产生多重耐药[21,95,174]。

(三)适应性耐药

适应性耐药是可诱导的,并取决于一种抗菌药物或其他环境刺激物的存在[141]。目前认为,许多触发因素包括抗生素、氧化应激(也是由抗生素诱导)、厌氧、阳离子和碳源等诱导了这种类型的耐药。这些因素可调控多种基因的表达,从而影响了外排泵、细胞被膜和酶[144]。铜绿假单胞菌适应性耐药的重要性与其基因组中存在丰富的调控基因储存库(占所有基因的 9.4%)是一致的。

β-内酰胺类抗生素的存在会诱导 β-内酰胺酶的转录,这是一种特定适应性耐受反应,可削弱 β-内酰胺分子对生物被膜的穿透作用[175]。

外排泵的上调已被证明是一种影响多类抗菌药物耐受性的非特异性机制,如氨基糖苷类(MexXY-OprM)、大环内酯类药物阿奇霉素和氟喹诺酮类(MexCD-OprJ)[141]、黏菌素(MexAB-OprM)[163],以及杀菌剂如 EDTA、SDS 和氯己定[176]。

脂多糖的变化可导致氨基糖苷类和黏菌素的适应性耐药。聚阳离子抗菌剂如氨基糖苷类、多黏菌素和阳离子抗菌肽,通过主动吸收横跨外膜。此过程涉及脂多糖上的二价阳离子结合位点与聚阳离子的相互作用,竞争性地取代这些阳离子而造成了局部破坏,这使聚阳离子药物通过外膜成为可能。对多黏菌素和宿主阳离子抗菌肽的适应性耐药是由低浓度二价阳离子(Mg^{2+} 和 Ca^{2+})介导的,从而激活双组分调控系统和随后诱导了 *arn* 操纵子(参见上述"多黏菌素类耐药机制"),并引起抗假单胞菌的黏菌素存在时的适应性耐药。如前所述,生物被膜型铜绿假单胞菌的适应性耐药备受关注。大剂量抗菌药物的最佳使用方案是基于适应性耐药相关知识,这可防止感染部位非致死剂量导致适应性耐药激活,如高初始剂量的氨基糖苷类和黏菌素。

(四)铜绿假单胞菌生物被膜对抗生素的耐受性

生物被膜对抗菌药物的耐受性由多种因素所致:抗菌药物在基质中的扩散能力减弱、细菌在生物被膜中因缺氧所致的生理异质性,以及应激反应机制上调致使代谢活性降低和适应性耐受[177]。由于生物被膜对免疫系统的耐受性,仅用抗菌药物抑制生物被膜将导致感染的抑制,这可能会防止炎症性病理改变,但不能清除感染[40]。

(五)药敏试验

在全世界,依据培养基的选择、接种物制备、抗菌药物纸片含量、折点及折点解释等方面,敏感性试验的方法多种多样。即便考虑到这些变量,但由于铜绿假单胞菌存在多重耐药机制,包括天然耐药和获得性耐药,并常常同时呈低水平表达,故铜绿假单胞菌敏感性试验仍然是一个挑战。在临床实验室,假单胞菌属的药物敏感性试验可选用纸片扩散法、琼脂或肉汤稀释法、Etest 法(bioMérieux),或自动化系统的微量肉汤稀释法等,这些方法都基于欧洲抗菌药物敏感试验委员会(EUCAST)公布的折点[178],效果良好。纸片扩散法对大多数铜绿假单胞菌临床分离株而言令人满意[179]。该方法的局限性在于缺乏定量结果(MIC)并存在漏判低水平耐药株的风险。现已证明,对从 CF[180,181] 和非 CF[182] 患者分离的菌株,Etest 法与琼脂稀释法的测定结果有很好的相关性。纸片扩散法抑菌环直径和 MIC 折点解释已经由一些欧洲国家级委员会(如英国抗菌化疗学会)和国际委员会如欧洲的 EUCAST(http://www.eucast.org)、美国临床和实验室标准化研究协会(CLSI)(http://www.clsi.org/)及其他一些机构进行了标准化。自 2013 年起,美国抗菌药物敏感性试验委员会(USCAST)已经在美国启动了类似的工作(http://www.uscast.org)。尽管一些协调工作已经开始,但是这些机构之间的分歧依然存在,故药敏结果应当按照各单位的操作程序进行报告。EUCAST 关于敏感铜绿假单胞菌

菌株的临床MIC折点标准如下：哌拉西林和哌拉西林/他唑巴坦≤16 μg/ml，替卡西林和替卡西林/克拉维酸≤16 μg/ml，头孢他啶和头孢吡肟≤8 μg/ml，头孢他啶/阿维巴坦≤8 μg/ml，头孢洛扎/他唑巴坦≤4 μg/ml 亚胺培南≤4 μg/ml，美罗培南≤2 μg/ml，多利培南≤1 μg/ml，氨曲南≤1 μg/ml，环丙沙星≤0.5 μg/ml，左氧氟沙星<1 μg/ml，庆大霉素、奈替米星和妥布霉素≤4 μg/ml，阿米卡星<8 μg/ml。

比较CLSI、EUCAST和美国抗生素敏感性试验委员会特定抗菌药物解释标准的MIC折点表可查阅 http://www.uscast.org。

据报道，对来自非CF患者的假单胞菌进行检测时，大多数自动化系统的结果与参考方法具有良好的相关性[104,183-184]。对各种自动化系统检测性能评估结果的解释必须谨慎，因为测试的菌株数量通常是有限的，尤其是对非铜绿假单胞菌菌株而言更应如此。尽管大多数铜绿假单胞菌分离株在琼脂培养基上生长良好，但是一些菌株在肉汤中的生长情况是可变的，这可能会对仅依靠自动化系统的实验室造成困难。或者使用一种液体培养基，可有助于外排泵耐药表型的检测，而基于固体培养基的试验则可能漏检此表型[185]。这也许可以解释比较不同的敏感性试验方法时一些结果上的差异。

有些抗生素的敏感性试验面临特别的挑战。

1. 碳青霉烯类药物敏感性试验 亚胺培南或美罗培南MIC升高可能是多种耐药机制联合所致，包括影响AmpC表达的突变合并OprD孔蛋白突变及外排泵过表达，或联合碳青霉烯酶表达等。从CF患者中分离到的耐碳青霉烯类菌株通常同时存在多种突变机制，但不包括产碳青霉烯酶[186-187]。然而，碳青霉烯酶多存在于分离自医疗保健机构或医院内非CF患者的铜绿假单胞菌，此酶的检测对于医院内感染控制非常重要。由于缺乏治疗方案，防止产碳青霉烯酶菌株的传播非常重要。目前，已有一系列用于检测碳青霉烯酶表型和基因型的方法。已研发出底物显色法相关产品，如 chromID CARBA（bioMérieux）和 HardyCHROM Carbapenemase（最近更名为 HardyCHROM CRE；Hardy Diagnostics，Santa Maria，CA）等。最近已有多种表型筛查方法可用于检测产碳青霉烯酶铜绿假单胞菌，这些方法具有较高的敏感性和特异性[188]。商品化检测方法包括 Rapidec Carba NP（bioMérieux，Marcy-l'Étoile，France）、Neo-Rapid Carb Screen 试剂盒（Rosco Diagnostica，Taastrup，Denmark）和 Rapid Carb Blue Screen（Rosco Diagnostica）等。这些方法是基于亚胺培南被细菌裂解物水解后pH指示剂的颜色变化。手工快速表型筛查方法有 Manual Carba NP CLSI、Manual Blue Carba 和 Modified Carba NP 法。基于生长的方法包括硼酸协同试验、亚胺培南和亚胺培南/EDTA的MBL Etest（bioMérieux），改良 Hodge 试验和碳青霉烯类灭活试验等。

在参考实验室中，碳青霉烯酶基因的检测可以使用PCR的方法或全基因组测序[189,190]。Cepheid 开发了一种快速的基因检测方法——Xpert Carba-R 法，可以检测5个碳青霉烯酶基因（bla_{KPC}、bla_{NDM}、bla_{IMP}、$bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ 和 bla_{VIM}）。最近一项研究表明，对于耐美罗培南的革兰阴性杆菌，包括铜绿假单胞菌，该方法具有100%的阳性预测值和阴性预测值[191]。

2. 黏菌素药敏试验 黏菌素在多重耐药铜绿假单胞菌治疗中的应用越来越广泛。然而，纸片扩散法与MIC法结果一致性较差，这可能是上述适应性耐药机制所致[192]。

2016年，CLSI-EUCAST多黏菌素折点联合工作组同意黏菌素MIC测定应使用ISO-20776标准肉汤微量稀释法，可在不含聚山梨酯-80等添加剂的普通聚苯乙烯平板中，使用硫酸多黏菌素进行操作，弃用纸片扩散法。CLSI和EUCAST标准中铜绿假单胞菌的黏菌素折点一致（敏感≤2 mg/L）。Chew 等[193]指出商品化和自动化微量肉汤稀释系统的结果与作为金标准的肉汤微量稀释法相比非常相近。

3. 分离自CF患者铜绿假单胞菌的敏感性 对微生物学实验室而言，从囊性纤维化患者标本中分离铜绿假单胞菌具有一定难度。这些患者标本中分离的菌株通常表现出混合的菌落形态，包括黏液型和非黏液型，以及小菌落变异型，黏液表型在CF患者肺部是以类似生物被膜的小菌落形式生长。铜绿假单胞菌的敏感性试验因受某些影响因素的影响而较为复杂，这些因素包括药敏结果和临床疗效之间缺乏相关性[194]、同一形态的细菌存在不同的敏感性模式[195]、敏感性试验重复性差、耐药性被低估及高突变菌株的出现[95]。CF患

者标本中通常能同时分离到铜绿假单胞菌黏液和非黏液型菌落，黏液型菌落往往比非黏液型菌落[196]更敏感，并且比非黏液型菌落具有更低的β-内酰胺酶活性。一种可能的解释是，这些菌株免受抗生素的选择性压力和多形核白细胞释放的氧自由基的侵害，特别是来自接受妥布霉素或黏菌素吸入治疗的患者，此压力可导致抗菌耐药性增加的小菌落变异型的出现，导致细菌自动聚集生长习性和生物被膜形成能力增强[5,36,92]。而后，生物被膜中的细菌细胞适应于共生细菌群落，此群落中产藻酸盐的黏液型细菌为生物被膜提供物理保护屏障，而高度耐药的非黏液型细菌能抵御抗生素的杀灭作用[196]。生物被膜细菌获得耐药表型的能力增强[197]和抗生素治疗选择出的高突变株[95,198]可进一步解释慢性感染CF患者为何难以根除铜绿假单胞菌。由于生物被膜中的细菌表现出比浮游细菌更高的MIC值，故对浮游细菌[199]进行常规药敏试验可能会低估生物被膜型细菌的耐药性，并可能导致治疗失败。一项对597株分离自CF患者的细菌的研究表明[179]，纸片扩散法和Etest法作为常规敏感性试验方法通常是可以被接受的。然而，使用扩散法检测黏液型细菌对哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦和美罗培南的药物敏感性结果相关性较差。纸片扩散法比Etest法更容易漏检细菌耐药性，尤其对头孢他啶、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦进行测试时。

在纸片扩散法或Etest法中，3个或更多抗菌药物的抑菌环重叠区内若出现耐药突变亚群[200]，可用以检测高突变菌株。

黏液型细菌对自动化系统是一个特殊的挑战[180,185,201]。敏感性可能被高估，因为黏液样菌株通常在24 h内生长不良。人们更愿意选用孵育时间可延长的自动化系统。另一方面，耐药性被高估可能是由于大量的胞外多糖的存在，导致浑浊但并没有足够的细菌生长量。这些局限性使得许多微生物学家常规测试黏液型铜绿假单胞菌时避免使用自动化仪器。对直接分离自痰标本不同表型的菌落或这些菌落次代分离株进行检测，结果显示纸片扩散法和MIC法的敏感性试验与临床疗效均有较好的相关性，这为临床提供了有价值的敏感性数据，并显著节省了时间和成本。然而，敏感菌株的相关性似乎比耐药菌株更好。建议采用Etest法直接检测痰标本中细菌的敏感性，以替代细菌形态学试验而评价体内情况，这是评估细菌群体的敏感性及其与其他细菌包括共生微生物的相互作用[202]。

已有其他一些方法被推荐用于更好地预测敏感性结果。生物被膜敏感性试验已经被开发，并证实生物被膜最小抑菌浓度要远远高于多种抗生素的传统MIC测定值，且能确定对生物被膜最有效的抗菌药物，但是根据这些方法的测定结果选择抗菌药物进行治疗时，临床预后并未得到改善[199,203-204]。使用微量滴定棋盘法、时间-杀菌试验、肉汤宏量稀释折点联合药敏试验或Etest法[202,205-206]进行协同试验，可用于评估抗生素组合在体外的活性，以预测体内的协同作用效果。协同试验劳动强度大，费时，重复性差，且由于仅有少量临床数据证明其与结局的预测有相关性，目前此法存在争议。

除铜绿假单胞菌外的其他假单胞菌属细菌通常对大多数抗假单胞菌抗生素及甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(大多数荧光假单胞菌/恶臭假单胞菌菌株除外)敏感，该特征可将它们与铜绿假单胞菌相鉴别。荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌和栖稻假单胞菌对氨曲南和替卡西林/克拉维酸更耐药。施氏假单胞菌通常对所有抗假单胞菌药物敏感。

十二、结果的评价、解释和报告

铜绿假单胞菌可能与定植或有临床意义的感染有关。革兰染色结果的解读常常指导后续的工作流程。被无定形物质包绕的革兰阴性细菌小集群的存在，提示细菌生物被膜的形成，这符合慢性感染的特点[40]。实验室应将此发现报告给临床医生，且这些菌株通常呈现出缓慢生长的特性，故孵育时间应当延长3～5天。多形核白细胞[40]内出现此类细菌强烈提示该菌是真正的感染菌而非定植菌。从无菌部位分离到铜绿假单胞菌应解释为可能的感染。从混合培养物中分离到的菌株需结合直接涂片、其他分离株和临床病史判断其致病性。从慢性感染部位如CF患者呼吸道分离的细菌，经常表现出多种形态，而使鉴定变得困难。分子生物学方法在鉴定这些细菌方面发挥着越来越大的作用，尤其在流行病学研究中。细菌耐药性的增加、结果重复性差且缺乏临床相关性，导致难以进行这类微生物的敏感性试验，尤其对黏液型

分离株更是如此。自动化系统检测假单胞菌属，尤其是黏液型分离株对哌拉西林和哌拉西林/他唑巴坦的药敏试验结果可能并不可靠，其药敏结果应当用纸片扩散法或 Etest 系统进行确认。基本了解细菌的天然和获得性多重耐药机制，对解读敏感性试验的结果和为临床医生提供治疗建议是必不可少的。实验室很少分离到其他假单胞菌属细菌，且通常没有临床意义。在进一步处理前，考虑革兰染色及临床相关性非常重要。

参考文献请扫二维码查阅

第45章 伯克霍尔德菌属、窄食单胞菌属、罗尔斯顿菌属、贪铜菌属、潘多拉菌属、短波单胞菌属、丛毛单胞菌属、代尔夫特菌属、食酸菌属

JOHN J. LIPUMA, BART J. CURRIE, SHARON J. PEACOCK, PETER A. R. VANDAMME

（刘瑛 译；魏莲花、王辉 审校）

一、分类

本章讨论的许多细菌曾属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)，但为了与以系统发育为基础的现代分类学相一致，假单胞菌属已经进行了分类学上的拆分。本章讨论的其他细菌，是在这次拆分之后描述及命名的。在这次拆分和重新分类后，假单胞菌属包含的菌种只限于 rRNA 同源Ⅰ群，这是由于它们包含了模式种——铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)(第 44 章)。原 rRNAⅡ群假单胞菌从属于 β-变形菌纲，重新分类为伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)和罗尔斯顿菌属(*Ralstonia*)[1-2]，这是一群值得关注的人类、动物和植物的原发性或条件性致病菌，也是在生物学防治(biological control)、修复和植物促生方面颇有潜力的环境微生物。过去 20 年，人们对这类微生物某些特性的兴趣导致了大批新菌种的发现和描述。现今，伯克霍尔德菌属包含了 100 余种正式命名的菌种，其中大多分离自土壤和水样。尽管伯克霍尔德菌属菌种具有强大的代谢能力和生物技术应用潜力，但它们仍是臭名昭著的机会致病菌(见下文)。伯克霍尔德菌属在农业上的应用存在争议。近期通过 16S rRNA 的比较研究，发现了该属的系统发育多样性，并将其划分为狭义的伯克霍尔德菌属(其中大多数为人类病原体)和几个新菌属，即 *Paraburkholderia*、*Caballeronia* 和 *Robbsia*(译者注：上述 3 个拉丁文没有中文译名)，这些新菌属主要包括来源于环境的菌种[3-5]。

其他一些伯克霍尔德菌属样(*Burkholderia*-like)菌种的分类学位置介于伯克霍尔德菌属和罗尔斯顿菌属之间，且具有独特的系统发育谱系，现已被分类为新的菌属，即潘多拉菌属(*Pandoraea*)[6]。16S rRNA 基因序列的比较分析提示，罗尔斯顿菌属存在 2 个不同的亚系(sublineages)[7]，表型的差异进一步支持了该结论。曾有提议把富养罗尔斯顿菌(*Ralstonia eutropha*)谱系中的相应菌种归入一个新的菌属，即沃特斯菌属(*Wautersia*)，而包含模式种——皮氏罗尔斯顿菌(*Ralstonia pickettii*)的谱系则延续罗尔斯顿菌属这个名称。此后不久，人们开始了解到[8]沃特斯菌属的模式种——富养沃特斯菌(*Wautersia eutropha*)和杀手贪铜菌(*Cupriavidus necator*)是同一个菌种，且杀手贪铜菌是贪铜菌属(*Cupriavidus*)的模式(且唯一)种，此菌为环境微生物，于 1987 年被有效命名，这一时间远早于 16S rRNA 基因序列研究普及的年代[9]。为符合《细菌系统命名国际法规》(*International Code of Nomenclature of Bacteria*)[10]，沃特斯菌属不得不被贪铜菌属所替换，其属内所有菌种变更为贪铜菌属菌种。

虽然一些伯克霍尔德菌属菌种已分离自人类临床标本，但通常认为只有洋葱伯克霍尔德菌复合群(*Burkholderia cepacia* complex)、唐菖蒲伯克霍尔德菌(*B. gladioli*)[包括先前分类的椰毒伯克霍尔德菌(*B. cocovenenans*)[11]](译者注：按参考文献[11]，唐菖蒲伯克霍尔德菌和椰毒伯克霍尔德菌属于同一菌种，且唐菖蒲伯克霍尔德菌具有命名优先权)、鼻疽伯克霍尔德菌(*B. mallei*)

和类鼻疽伯克霍尔德菌(*B. pseudomallei*)等是人类或动物致病菌。多相分类(polyphasic taxonomic)研究显示,洋葱伯克霍尔德菌样(*B. cepacia*-like)细菌至少包含20个不同的基因种,统称为洋葱伯克霍尔德菌复合群[12-13]。有学者对来源于囊性纤维化(cystic fibrosis,CF)患者和其他患者标本的洋葱伯克霍尔德菌的细菌多样性进行调查。结果显示,在洋葱伯克霍尔德菌复合群中存在几个额外的菌群,应用传统方法或分子鉴定方法并不能将这些菌群归为洋葱伯克霍尔德菌复合群内某一个既定的菌种[14],需要进一步进行多相分类分析以确定这些菌群是否代表洋葱伯克霍尔德菌复合群中额外增加的新菌种,或代表既定菌种的新变种。几乎所有的洋葱伯克霍尔德菌复合群内的菌种均已分离自人类临床标本。但此群内的多食伯克霍尔德菌(*B. multivorans*)和新洋葱伯克霍尔德菌(*B. cenocepacia*)是CF患者最常见的机会致病菌[14]。

除洋葱伯克霍尔德菌复合群、唐菖蒲伯克霍尔德菌、鼻疽伯克霍尔德菌和类鼻疽伯克霍尔德菌外,现今伯克霍尔德菌属还包括另外80个正式命名的菌种,这些微生物大多与人类疾病无关。荚壳伯克霍尔德菌(*B. glumae*)、泰国伯克霍尔德菌(*B. thailandensis*)、真菌伯克霍尔德菌(*B. fungorum*)、热带伯克霍尔德菌(*B. tropica*)、真菌内生伯克霍尔德菌(*B. endofungorum*)和根瘤菌素伯克霍尔德菌(*B. rhizoxinica*)等菌种引起人类感染的相关报道非常少见[15-19],只有前2种被保留在修订后的伯克霍尔德菌属内。正式命名菌种的完整概览可通过网站如 http://www.bacterio.net/获得。

现今,罗尔斯顿菌属包含3种人类病原菌,即皮氏罗尔斯顿菌、解甘露醇罗尔斯顿菌(*R. mannitolilytica*)(以前称为皮氏罗尔斯顿菌3/'*thomasii*'生物变种)[20]和危险罗尔斯顿菌(*R. insidiosa*)[21]。其他可引起人类感染的曾命名为罗尔斯顿菌属的菌种之后被重新归类为贪铜菌属[8],包括少见贪铜菌(*C. pauculus*)(以前称为CDC Ⅳc-2群)[22]、吉拉迪贪铜菌(*C. gilardii*)[23]、呼吸道贪铜菌(*C. respiraculi*)[24]和台湾贪铜菌(*C. taiwanensis*)[25],另外一些贪铜菌属菌种迄今为止仅分离自环境标本。

目前,潘多拉菌属包括5个分离自人类临床标本的菌种,即奸诈潘多拉菌(*Pandoraea apista*)、居肺潘多拉菌(*P. pulmonicola*)、留肺潘多拉菌(*P. pnomenusa*)、痰潘多拉菌(*P. sputorum*)和纽伦堡潘多拉菌(*P. norimbergensis*)。潘多拉菌属还包括几个未命名的菌株,且每个菌株代表了一个不同的潘多拉菌属菌种[6],这些菌种已分离自动物和环境标本。

原假单胞菌属rRNA同源Ⅲ群微生物也属于β-变形菌纲,现划入丛毛单胞菌科(*Comamonadaceae*)。该科包括丛毛单胞菌属(*Comamonas*)、代尔夫特菌属(*Delftia*)和食酸菌属(*Acidovorax*)[26,27],每一个属所包含的菌种数不断增加,且主要来源于环境。丛毛单胞菌属设立于1985年,仅含一个菌种即土生丛毛单胞菌(*Comamonas terrigena*)。此后不久,食酸假单胞菌(*Pseudomonas acidovorans*)和睾丸酮假单胞菌(*Pseudomonas testosteroni*)重新归为丛毛单胞菌属成员,再后,前者又重新分类为食酸代尔夫特菌(*Delftia acidovorans*)[28]。从人类临床标本中分离的土生丛毛单胞菌曾包含3个菌群[29],现称为土生丛毛单胞菌、水生丛毛单胞菌(*C. aquatica*)和凯斯特丛毛单胞菌(*C. kerstersii*)[30]。另外,德氏食酸菌(*Acidovorax delafieldii*)、温和食酸菌(*A. temperans*)和最近新发现的沃特斯食酸菌(*A. wautersii*)已分离自人类临床标本[31]。

原rRNA同源Ⅳ群的假单胞菌属菌种从属于α-变形菌纲,现归类为短波单胞菌属(*Brevundimonas*)。缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*)、泡囊短波单胞菌(*B. vesicularis*)和范氏短波单胞菌(*B. vancanneytii*)已分离自人类临床标本[32-33]。其他短波单胞菌属菌种主要来源于环境。

最后是以嗜麦芽假单胞菌(*Pseudomonas maltophilia*)为代表的原假单胞菌属rRNA同源Ⅴ群。基于基因型和表型特征,它被建议从原先的属转为γ-变形菌纲中的黄单胞菌属(*Xanthomonas*),之后又归类为新的窄食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)[34-35]。嗜麦芽窄食单胞菌(*S. maltophilia*)是一种众所周知的机会致病菌[36],且具有分类学异质性[37],其他窄食单胞菌属菌种则被认为仅是环境细菌。

二、概述

伯克霍尔德菌属、罗尔斯顿菌属、贪铜菌属、

潘多拉菌属、短波单胞菌属、丛毛单胞菌属、代尔夫特菌属和食酸菌属等是一类需氧、不产芽胞、直或微弯曲的革兰阴性杆菌，长 1～5 μm，宽 0.5～1.0 μm[38]。窄食单胞菌属为直杆菌，通常比其他菌属的细菌稍小（长 0.7～1.8 μm，宽 0.4～0.7 μm）[38]。除鼻疽伯克霍尔德菌外，这些细菌因具有一根或多根极生鞭毛而有动力[39]。这类细菌触酶呈阳性，大多数氧化酶呈弱阳性或强阳性。所有细菌表现为非发酵型。除泡囊短波单胞菌的某些菌株外，其余细菌均能在麦康凯平板上生长。大多数菌种可氧化降解葡萄糖并可将硝酸盐分解为亚硝酸盐或氮气。一些特定菌种可呈现特征性的菌落形态或色素。它们的营养来源十分广泛，不同种类细菌能利用不同的简单或复杂糖类、醇类和氨基酸作为碳源。某些菌种可在 4℃生长，但大多数为嗜温性细菌，最佳生长温度为 30～37℃[39]。对一些菌属而言，可在更高温度（即 42℃）生长的特性有助于菌种的鉴定。

三、流行病学和传播

伯克霍尔德菌属、罗尔斯顿菌属、贪铜菌属、潘多拉菌属、丛毛单胞菌属、代尔夫特菌属、食酸菌属、短波单胞菌属和窄食单胞菌属存在于水、土壤、根际及植物（包括水果和蔬菜），它们在全球分布广泛。这些属的成员是公认的植物病原菌，许多菌种首次描述时亦是如此。由于能在含水的环境中生存，故这些细菌作为院内感染的机会致病菌，目前已成为医院及卫生保健机构中非常棘手的问题。

由于洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种所具有的生物学特性和其对 CF 患者的致病性，人们对该菌种在自然界的分布已进行了深入研究[40]。洋葱伯克霍尔德菌复合群细菌因可能具有抗真菌、抗线虫或促植物生长的特性，而成为引人关注的生物杀虫剂或肥料[41]。该群细菌营养来源的多样性使之可用于污染土壤的生物修复。临床医生很容易从一些土壤标本中分离到复合群内的某些菌种，特别是双向伯克霍尔德菌（*B. ambifaria*）、花园伯克霍尔德菌（*B. anthina*）和吡咯菌素伯克霍尔德菌（*B. pyrrocinia*）[42]，但其他菌种则很少来源于环境，包括分离自 CF 患者的洋葱伯克霍尔德菌复合群最常见的菌种之一的多食伯克霍尔德菌[43]。各类食品、瓶装水和未经巴斯德法消毒的乳制品中可发现洋葱伯克霍尔德菌复合群细菌[44]。由于对抗生素和消毒剂的天然耐药性，洋葱伯克霍尔德菌复合群细菌也是人们熟知的药物制剂污染菌[45]。许多与医疗相关的伯克霍尔德菌属感染暴发是由受污染的医疗设备和产品引起的，包括漱口水、超声波凝胶、皮肤消毒剂和药物[40]。

分子和传统流行病学调查为洋葱伯克霍尔德菌复合群菌株在 CF 患者个体间传播或所谓的“局部流行”提供了有力证据[40]。20 世纪 90 年代和 21 世纪初，隶属于 ET12 种系（电泳型 12）的某一克隆株在加拿大东部和英国的 CF 患者中较常见[46-47]，该新洋葱伯克霍尔德菌与临床预后不良相关，其特点为具有独特的电缆样菌毛，并产生一种与介导黏附呼吸道上皮细胞相关的黏附素。在此期间，美国大西洋沿岸中部地区 CF 患者的感染主要是由新洋葱伯克霍尔德菌 PHDC 菌株引起，而在一些欧洲国家的 CF 患者及农业土壤中也能检出该菌株[48-50]。新洋葱伯克霍尔德菌“中西部克隆株（Midwest clone）”可见于美国中西部的 CF 患者[51]。

类鼻疽伯克霍尔德菌和泰国伯克霍尔德菌主要分布于热带和亚热带地区的土壤和地表水。泰国东北部、柬埔寨西部、老挝、越南中部及南部的水稻种植区也已分离到这 2 种细菌[52-54]。在澳大利亚北部，类鼻疽伯克霍尔德菌的分布情况与下列因素有关：原生态土地上的天然草种、非原生态环境中的家畜动物和土壤较低的 pH，以及土壤所呈现的不同质地和颜色等[55-56]。类鼻疽伯克霍尔德菌偶尔可通过患类鼻疽动物的输入而在温带环境中存活[57]。最近的环境学研究报道，已从澳大利亚北部的水井中鉴定出一种与泰国伯克霍尔德菌亲缘关系较近的汉普蒂社伯克霍尔德菌（*B. humptydooensis*）新种[58]。最近在澳大利亚北部发现了另外 2 个新菌种，即潟湖伯克霍尔德菌（*B. stagnalis*）和领地伯克霍尔德菌（*B. territorii*），在这之前，潟湖伯克霍尔德菌曾分离自一名澳大利亚 CF 患者的痰和一名美国患者的气管抽吸物[13]，这 2 个菌种在系统发育学上都属于洋葱伯克霍尔德菌复合群。

已知的类鼻疽伯克霍尔德菌地方流行区域正在扩大，超出了传统的类鼻疽流行地区——东南

亚和澳大利亚北部。类鼻疽病例报道日益增加，它们来自美洲、马达加斯加、一些非洲国家、毛里求斯、印度和南亚其他地区、中国大陆和中国台湾地区。目前还未明确这在多大程度上反映了流行区域的真正扩大，而非揭示了这个菌种长期的存在情况[59-60]。全球疾病负担的最新模型估计，类鼻疽在已知流行的 45 个国家中被严重漏报，并且在 34 个从未报告过该疾病的国家中也可能存在地方性流行[61]。

嗜麦芽窄食单胞菌可引起院内感染，事实上，它是重症监护病房患者中分离到的最常见菌种之一[62]，但医生对其引起医院获得性感染的来源却知之甚少[36]。

与洋葱伯克霍尔德菌复合群某些菌株不同，唐菖蒲伯克霍尔德菌、类鼻疽伯克霍尔德菌、鼻疽伯克霍尔德菌、嗜麦芽窄食单胞菌及本章讨论的其他菌种尚缺乏人与人之间传播的证据。

四、临床意义

(一)洋葱伯克霍尔德菌复合群和唐菖蒲伯克霍尔德菌

“洋葱伯克霍尔德菌”菌种一直是公认的人类机会致病菌，能引起有基础疾病患者的各种感染，包括菌血症、尿路感染、脓毒性关节炎、腹膜炎和肺炎[40]。慢性肉芽肿性疾病(chronic granulomatous disease，CGD)和 CF 患者尤其易受感染[63]。“洋葱伯克霍尔德菌”作为院内感染病原菌已经有一段历史，其感染与被污染的院内设施、药品及消毒剂如聚维酮碘、氯己定、苯扎氯铵等有关[40]。曾发生过因喷雾器或雾化吸入药物如沙丁胺醇的污染而引起重症监护病房机械通气患者呼吸道院内感染的暴发。有报道显示，血培养系统或消毒剂污染可导致假性菌血症(pseudobacteremia)。早期报道，CF 患者感染洋葱伯克霍尔德菌会引起肺功能急剧恶化和脓毒症(简称洋葱综合征)[64]。临床预后研究一致认定“洋葱伯克霍尔德菌”感染是 CF 患者发病率和病死率升高的一个显著的独立危险因素[65]。

有研究发现，之前鉴定为“洋葱伯克霍尔德菌”的细菌可以区分出数个亲缘关系密切的菌种，由此激发了学者探讨每一个菌种临床意义的兴趣。尽管各个 CF 治疗中心的患者感染率明显不同，但在美国，约 3%CF 患者感染的致病菌为洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种[66]，感染率随患者年龄的增加而上升，成年 CF 患者的感染率为 5%～7%[66]。许多菌株对广谱抗菌药物耐药(见下文)，此类细菌引起的肺部感染通常治疗难度较大。此外，由于洋葱伯克霍尔德菌复合群感染的患者术后预后差，大多数 CF 治疗中心将其视为肺移植的禁忌证之一，而目前肺移植是提高晚期肺疾病患者中期存活率的唯一治疗选择。因此，这些菌种导致的呼吸道感染是引起 CF 患者及其医护人员高度担忧的一个原因。

洋葱伯克霍尔德菌复合群目前所包含的 20 个菌种中的大部分均已分离自 CF 患者，但不同菌种在 CF 患者人群中的分布很不均衡。在美国，约 50%的洋葱伯克霍尔德菌复合群感染由多食伯克霍尔德菌和新洋葱伯克霍尔德菌引起，而另外 20%的感染由越南伯克霍尔德菌(*B. vietnamiensis*)、洋葱伯克霍尔德菌和污染伯克霍尔德菌(*B. contaminans*)[译者注：应为欺瞒伯克霍尔德菌(*B. dolosa*)]引起[14,40]。之前，CF 患者中伯克霍尔德菌属感染大多是由新洋葱伯克霍尔德菌引起的[14]，而现在，美国 CF 患者中多食伯克霍尔德菌感染人数约是新洋葱伯克霍尔德菌感染人数的 3 倍[40]。在英国，CF 患者中多食伯克霍尔德菌的分离率也超过了新洋葱伯克霍尔德菌[67]。

其余的洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种则很少分离自人类，包括稳定伯克霍尔德菌(*B. stabilis*)、双向伯克霍尔德菌、花园伯克霍尔德菌、吡咯菌素伯克霍尔德菌、污染伯克霍尔德菌、种子伯克霍尔德菌(*B. seminalis*)、扩散伯克霍尔德菌(*B. diffusa*)、耐金属伯克霍尔德菌(*B. metallidurans*)[译者注：与后文出现的金属伯克霍尔德菌(*B. metallica*)可能为同一种菌]、森林伯克霍尔德菌(*B. arboris*)、隐蔽伯克霍尔德菌(*B. latens*)、广泛伯克霍尔德菌(*B. lata*)、假多食伯克霍尔德菌(*B. pseudomultivorans*)及潟湖伯克霍尔德菌等[13,40]。值得注意的是，CF 患者中 30%的洋葱伯克霍尔德菌复合群感染由上述菌种引起(J. J. LiPuma，未发表数据)。复合群中还有乌汶伯克霍尔德菌(*B. ubonensis*)和领地伯克霍尔德菌 2 个菌种在 CF 中尚未报道。基于遗传分析，一些 CF 患者感染的细菌应属于洋葱伯克霍尔德菌复合群，但却无法归类为任何一个现已命名的菌种，故这些菌株极有可能是复合群中另外的新菌种。

现有数据显示，分离自CF患者的洋葱伯克霍尔德菌复合群内不同菌种的毒力和对临床造成的影响不尽相同。例如，有关肺移植受者的研究表明，术前感染新洋葱伯克霍尔德菌的患者比感染其他洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种的患者术后病死率更高[68-69]。然而，严谨的移植预后多因素分析尚无明确结论[70]。虽然，临床医生几乎可以确定新洋葱伯克霍尔德菌是与洋葱综合征最相关的菌种，但这种细菌与不良预后是否显著相关仍有待进一步证明。亦有病例报道记载了其他的洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种，如多食伯克霍尔德菌、稳定伯克霍尔德菌和欺瞒伯克霍尔德菌(*B. dolosa*)等与致死性感染相关[71-72]。尽管菌种的检出频率和预后不良似乎呈正相关，但若考虑洋葱伯克霍尔德菌复合群内各菌种的相对毒力，需要更明确的研究结果才能得到可靠的结论。有证据表明，某些菌种内的特定菌株在人类感染中毒性相对更强，特别是新洋葱伯克霍尔德菌ET12流行株和欺瞒伯克霍尔德菌SLC6菌株在CF患者中表现出更强的毒力[73-74]。不过，在得出特定菌株相对毒力更强的可靠结论之前，还需进行深入的预后比较性研究。

唐菖蒲伯克霍尔德菌是最值得关注的植物病原体，也能引起CF或CGD患者感染，偶尔可引起一些免疫缺陷患者感染[75]。零星的报道描述了唐菖蒲伯克霍尔德菌可引起CF患者发生肺功能急剧恶化、复发性软组织脓肿及肺移植后严重感染[70,76]。由于该类细菌通常能在分离洋葱伯克霍尔德菌复合群的选择性培养基上生长，且商品化测试系统可能将其错误鉴定为洋葱伯克霍尔德菌复合群的成员[77]，因而唐菖蒲伯克霍尔德菌的准确鉴定存在一定困难，这曾经对更全面地评价CF中唐菖蒲伯克霍尔德菌感染的流行病学和临床意义造成了困扰。通过遗传方法对该菌种进行更准确的鉴定表明，相对洋葱伯克霍尔德菌复合群中的大多数菌种(除多食伯克霍尔德菌和新洋葱伯克霍尔德菌外)，唐菖蒲伯克霍尔德菌感染在CF患者人群中更为普遍[40]。

(二)类鼻疽伯克霍尔德菌和鼻疽伯克霍尔德菌

类鼻疽伯克霍尔德菌是人类和动物类鼻疽的病原体，流行于东南亚和澳大利亚北部热带，且在印度次大陆、非洲和中美洲、南美洲也正日益受到关注[59,61,78-79]。在疾病流行地域，感染发生呈季节性，高达85%的病例发生在季风雨季期间。极端天气事件和环境干扰与澳大利亚类鼻疽的群体发病相关[80]，2004年的亚洲海啸导致此种疾病遍及整个受灾地区[81,82]。由于前往东南亚各国和澳大利亚北部的旅行日渐频繁，在返回欧洲各国和美国的旅客中，有关类鼻疽病例的报道越来越多[57]。对于那些CF患者，类鼻疽是一个特别重要的潜在旅游相关性疾病，即使延长CF患者的疗程，类鼻疽伯克霍尔德菌仍可在呼吸道持续定植，且疾病反复发作并导致肺功能日益恶化[83-84]。对曾去过类鼻疽伯克霍尔德菌感染流行区域的患者出现不明原因发热或结核病样症状进行鉴别诊断时，需要考虑此类微生物感染的可能。

环境中的类鼻疽伯克霍尔德菌通过皮肤伤口或破损、吸入、误吸或摄入等途径而侵入人体，在流行区域摄入未经氯化消毒的水源这种感染途径则日益受到关注[85]。人畜共患病的报道极其少见，同样，人一人传播和实验室获得性感染亦非常罕见[78]。灾害性天气事件与呼吸道感染及高病死率的关联归因于该菌由皮肤侵入转为呼吸道吸入[86]，这种转换使类鼻疽伯克霍尔德菌有可能成为生物恐怖病原体。无类鼻疽流行区域旅游史的患者一旦分离出此菌，应立即报告当地或国家公共卫生监管部门。进一步详细信息见第15章或https://emergency.cdc.gov/bioterrorism/。

有类鼻疽伯克霍尔德菌暴露史的人员大多不会发生临床感染，某些地域普通人群中的血清阳性率高达80%[86-87]。人们已经认识到即使在暴露后的几十年，此菌的隐性感染亦可被重新激活，但此类病例占比少于5%[88]，这些病例很罕见，但却使其臭名昭著。绝大多数类鼻疽病例都是近期感染，潜伏期为1～21天(平均9天)[79]。类鼻疽伯克霍尔德菌感染导致临床疾病的危险因素包括糖尿病、酒精滥用、慢性肾病、慢性肺病、恶性肿瘤及免疫抑制治疗[88-90]。20%～36%的病例没有明确的危险因素，该组病例的病死率通常较低。尽管腮腺脓肿是公认的泰国和柬埔寨类鼻疽患儿重要临床表现[91]，但是此种疾病在儿童中并不多见。各临床中心类鼻疽的总病死率存在差异，具备最先进重症监护治疗技术的临床中心病死率为10%～15%，而资源匮乏地区则超过50%[78-79]。

50%的病例表现为肺炎，部分可进展为致命的脓毒症，也可能为不太严重的单侧肺部感染，后者与其他社区获得性肺炎或类结核病等慢性疾病不易鉴别[92]。仅有 10%的病例为慢性类鼻疽，其定义为病程>2 个月。总体而言，50%的病例伴有菌血症，血液中细菌浓度>100 CFU/ml 和血培养最初 24 h 出现细菌生长是高病死率的标志。轻度类鼻疽的临床症状仅为皮肤溃疡或脓肿而无全身表现[93]。其他常见临床表现包括泌尿生殖道感染、化脓性关节炎和骨髓炎等，伴有或不伴有菌血症[78-79,88]；前列腺脓肿尤为常见[94]，脓肿也可发生于脾、肝、肾和肾上腺；腮腺炎、淋巴结炎、鼻窦炎、睾丸炎、肌炎（尤其是腰肌脓肿）、感染性动脉瘤及心包和纵隔积液都已有报道。病变可能完全为化脓性，也可能包括微脓肿、肉芽肿或这些病症的组合。临床上脑膜炎较为罕见，但类鼻疽性脑脊髓炎综合征[88]和脑脓肿已有报道。

鼻疽是牲畜（尤其是马、骡、驴）的一种高度传染性疾病，其病原体是鼻疽伯克霍尔德菌。此菌可以通过病畜传播给人类[95]，是一种潜在的生物恐怖病原体。与类鼻疽伯克霍尔德菌不同，鼻疽伯克霍尔德菌是一类宿主适应性（host-adapted）病原体，它在宿主以外的环境中无法继续生存。鼻疽在大多数国家已被根除，但在中东地区、亚洲、非洲、南美洲和中美洲，该病仍存在地方性疫源地。过去 50 年中，美国唯一一例人鼻疽病例是一位生物防御科学家从实验室获得的感染[96]。人类的鼻疽和类鼻疽一样，可分急性或慢性，患者的临床表现和病程取决于感染途径、细菌感染数量及宿主危险因素。此菌经呼吸道吸入后可导致肺炎，并可能播散到内部器官和引起重症脓毒症。此菌侵入皮肤可导致皮肤结节及区域性淋巴结炎，也会引起潜在的播散性疾病。纵隔或外周结节在鼻疽中较类鼻疽更为普遍，未经治疗的病例往往呈化脓性脓肿。

(三)嗜麦芽窄食单胞菌

嗜麦芽窄食单胞菌是一种众所周知的人类机会致病菌，通常对健康人群不致病。它是引起农业机械等相关外伤伤口感染最常见的原因之一[97]，也是与高发病率和高病死率相关的重要院内感染病原菌，尤其对于虚弱或免疫功能低下的患者及需要通气支持的重症监护患者[36]。据报道，嗜麦芽窄食单胞菌可引起癌症或血液系统恶性肿瘤患者致命性感染，包括出血性肺炎[98-99]。最近几年，人类感染发生率有所增加，目前已报道的各种临床综合征包括菌血症、肺炎、尿路感染、眼部感染、心内膜炎、脑膜炎、软组织和伤口感染、乳突炎、附睾炎、胆管炎、骨软骨炎、滑囊炎及腹膜炎[100]。脓毒血症可伴有坏疽性深脓疱，这是一种常与铜绿假单胞菌和弧菌属（*Vibrio*）相关的皮肤损害。

嗜麦芽窄食单胞菌引起 CF 患者呼吸道感染的发生率似乎也有所增加[101]。但历史数据的不可靠性使医生无法得到明确的结论。2015 年，囊性纤维化基金会（CF Foundation）注册的 CF 患者中大 14%可检出嗜麦芽食单胞菌[66]。不过，大型多中心临床研究发现，嗜麦芽窄食单胞菌在 CF 患者中的检出比例更高，此菌在研究对象中的分离率仅次于铜绿假单胞菌。感染或定植常常是暂时的，30%的研究对象在 6 个月中至少有一次痰培养检出嗜麦芽窄食单胞菌[102]。几项有关该菌在降低 CF 患者肺功能方面起作用的病例对照研究并未得出一致结论[103]。

(四)罗尔斯顿菌属和贪铜菌属

如上所述，一些之前命名为罗尔斯顿菌属的菌种现归为贪铜菌属[8]。这 2 个属所包含的菌种中，皮氏罗尔斯顿菌因感染人类而最为知名。早期的报道介绍该菌可分离自各种临床标本和引起各种感染，包括菌血症、脑膜炎、心内膜炎及骨髓炎。有文献报道，在假性菌血症患者和院内感染暴发中可检出该菌，感染发生的原因是静脉注射药物、“无菌”水、生理盐水、氯己定溶液、雾化吸入溶液及静脉导管受到污染[104]。此菌也可分离自 CF 患者的呼吸道。然而根据表型，皮氏罗尔斯顿菌很容易与荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens*）和洋葱伯克霍尔德菌复合群的成员混淆[20,105]。此外，现在已知的一些皮氏罗尔斯顿菌样（*R. pickettii*-like）菌种也能感染人类，尤其是 CF 患者[106]。因此，根据以往的研究数据很难评估皮氏罗尔斯顿菌作为人类病原体的临床意义。

据报道，解甘露醇罗尔斯顿菌（曾称为皮氏罗尔斯顿菌 3/‘*thomasii*’变种）引起院内感染暴发和 1 例复发性脑膜炎[20]。CF 患者感染的罗尔斯顿菌属细菌大多为解甘露醇罗尔斯顿菌，其感染

患者数量是皮氏罗尔斯顿菌的 2 倍以上[106]。危险罗尔斯顿菌和呼吸道贪铜菌也可分离自 CF 患者[21,24]。曾经有学者从脑脊液中分离到吉拉迪贪铜菌[23]，而少见贪铜菌引起的菌血症、腹膜炎和腱鞘炎的病例亦有报道[22]，这 2 种细菌均可在 CF 患者的痰标本中检出[106]。虽然耐金属贪铜菌（*Cupriavidus metallidurans*）和巴塞尔贪铜菌（*Cupriavidus basilensis*）是否导致人类其他感染尚不明确，但最近，人们已在 CF 患者痰培养中分离到这 2 种细菌[106]。尽管已有这些发现，但罗尔斯顿菌属和贪铜菌属菌种对人类感染，特别是在 CF 患者中的作用仍有待进一步阐明[107]。

(五)其他属

通常，短波单胞菌属、丛毛单胞菌属、代尔夫特菌属、食酸菌属和潘多拉菌属菌种很少引起人类感染。人们对这些菌种的关注主要集中在它们作为植物病原体所起的作用及微生物的生物多样性和生物降解研究等方面。

短波单胞菌属偶尔分离自临床标本[108]。有各种基础疾病的患者发生泡囊短波单胞菌菌血症已有报道[109]；由于在 Thayer-Martin 琼脂上产生亮橙色菌落，故在子宫颈标本中已检测到该菌。已有学者从癌症患者的血液、尿和胸腔积液中检出缺陷短波单胞菌[110]。

在丛毛单胞菌属菌种中，睾丸酮丛毛单胞菌（*Comamonas testosteroni*）与人类感染密切相关，它能导致心内膜炎、脑膜炎和导管相关性菌血症[111-113]。同样，食酸代尔夫特菌也能引起感染，它可在菌血症、心内膜炎、眼部感染和化脓性中耳炎等患者的标本中检出[114]。食酸菌属已分离自各种临床标本，包括一例恶性血液病患者的血液样本[115]。食酸菌属某些种、睾丸酮丛毛单胞菌和食酸代尔夫特菌也已分离自 CF 患者的痰标本[116]（LiPuma，未发表），然而这些菌种在 CF 患者肺部疾病中所起的作用尚不明确。

除引起 CF 患者感染外[117-118]，潘多拉菌属也已分离自血液标本和慢性阻塞性肺疾病患者或 CGD 患者[119]，这些菌种对有基础疾病患者不良预后的作用还未明确。有报道描述了 1 例因结节病（sarcoidosis）而进行肺移植的留肺潘多拉菌感染患者从脓毒症、多器官衰竭到死亡[120]。

五、采集、运输和储存

本章描述的各属细菌可以在各种恶劣的环境和临床医疗环境的温度下生存。因此，按照第 19 章所列的标准化的收集、运输和储存技术，足以保证从临床标本中分离培养出这些微生物。确诊类鼻疽需进行类鼻疽伯克霍尔德菌分离培养，可通过额外收集咽拭子和直肠拭子并接种于选择性培养基（见下述“培养与分离”部分）（译者注：应为“分离程序”部分）提高其检出率，对疑似神经系统类鼻疽的患者需收集超出标准量的脑脊液用于培养[121]。

六、直接检查

除类鼻疽伯克霍尔德菌外，这些属的细菌形态相似，仅仅依据革兰染色很难将它们区分。类鼻疽伯克霍尔德菌可显示为小的、双极染色的革兰阴性杆菌，菌体类似于安全别针（图 45-1）。这种形态提示可能存在类鼻疽伯克霍尔德菌，但其敏感性和特异性并不足以做出临床推断性的病原学诊断。

虽然已有报道，PCR 方法可对分离培养后的洋葱伯克霍尔德菌复合群、类鼻疽伯克霍尔德菌、唐菖蒲伯克霍尔德菌、罗尔斯顿菌属和贪铜菌属某几个菌种、潘多拉菌属菌种及嗜麦芽窄食单胞菌进行鉴定（见下述“鉴定”部分），但采用 PCR 方法从临床标本中直接检测这些菌种仍仅限于研究[122-124]。有关 CF 患者痰标本的研究表明，对于某些洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种，有些标本可能 PCR 检测阳性但培养结果阴性，这就让研究者对以往 CF 患者感染的病原学诊断结果产生了不小的疑问。然而，由于缺乏可靠的金标准，应用 PCR 方法检测预期目标菌种的敏感性和特异性难以确定。不久的将来，实时定量 PCR 方法或下一代细菌基因组测序法有可能成为直接检测临床标本中上述菌种的替代方法。

由于类鼻疽伯克霍尔德菌脓毒症往往是致命的，患者通常入院几天内即死亡，而此时尚未获得培养结果，故研究者研发了一些快速的直接检测方法，其中包括乳胶凝集法、酶免疫法测定尿抗原

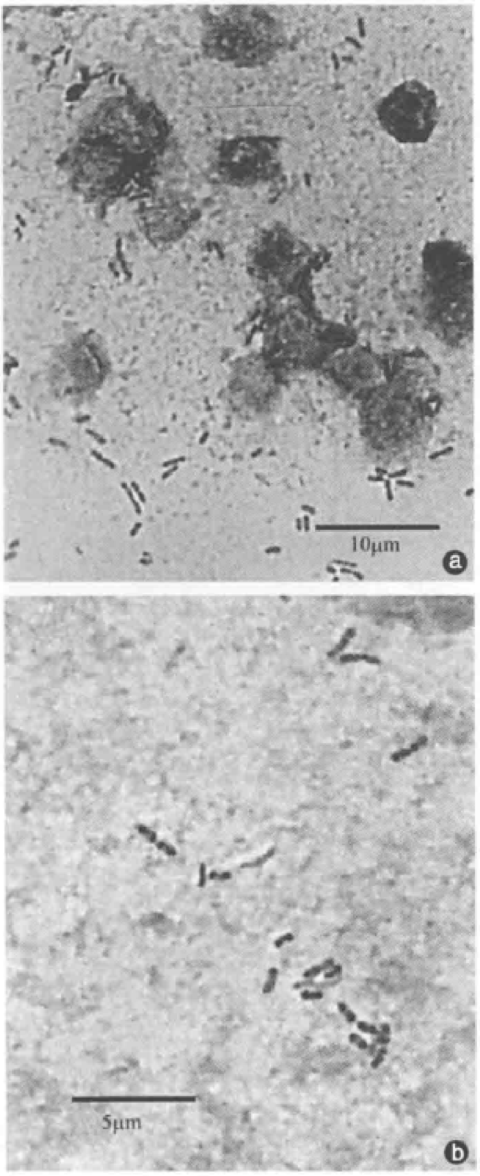


图 45-1 a. 血培养中类鼻疽伯克霍尔德菌革兰染色;b. 血平板菌落的类鼻疽伯克霍尔德菌革兰染色,见彩插

及直接荧光抗体(direct fluorescent-antibody,DFA)染色法[125-126]。曾有文献报道了一种直接荧光抗体检测法,其试剂是由类鼻疽伯克霍尔德菌特异单克隆抗体和 Alexa Fluor 488 荧光素制成[127],该文中提及的大部分试剂是自制的,并未商品化。为了快速诊断类鼻疽病[128],有学者开发了一种侧流免疫层析法,但该方法仍处于评估阶段。

有学者对以 16S rRNA 基因为靶向的常规 PCR 方法检测临床标本中类鼻疽伯克霍尔德菌进行了评价,此方法较敏感但缺乏特异性,导致阳性预测值仅为 70%[129]。目前,靶向测定类鼻疽伯克霍尔德菌的 16S rRNA、鞭毛蛋白(*fliC*)、核糖体蛋白亚基 S21(*rpsU*)或Ⅲ型分泌系统(type Ⅲ secretion system,TTS)编码基因的实时定量 PCR 方法已成功研发,使用纯培养细菌进行检测时,这些方法显示出高敏感性和高特异性[130-132]。然而,2 项有关实时定量 PCR 的临床评估的结果并不一致,一项以 TTS1 簇基因为靶标,敏感性为 91%[123];而另一项以 16S rRNA 基因为靶标,其敏感性仅为 61%[133]。PCR 方法检测脓液和其他体液标本的敏感性最高,但检测血标本敏感性较低,这很有可能是受细菌拷贝数的影响。已有学者对各种方法进行评价,以优化临床样本中细菌 DNA 的提取过程[134],并对已报道的实时定量 PCR 的靶基因进行对比研究,发现以 TTS1-*orf*2 作为靶基因是直接检测临床标本中类鼻疽伯克霍尔德菌的最佳方法[135]。环介导等温扩增法操作简便、快速,设备需求少,采用水浴或加热器维持恒定温度条件即可实现扩增。环介导等温扩增法已研发并用于类鼻疽伯克霍尔德菌的检测和类鼻疽诊断[136]。该方法用于实验室检测类鼻疽伯克霍尔德菌纯菌落既敏感又特异,检测临床标本时特异性为 100%,但诊断敏感性非常低(44%)。目前,分子检测方法的敏感性还未达到取代常规培养的要求。

七、分离程序

这些菌种在实验室标准培养基上生长良好,如 5%羊血和巧克力琼脂平板,这些培养基可用于不含混合菌群的无菌体液或组织中微生物的分离培养(第 21 章)。所有曾从血标本中分离培养得到的细菌,包括类鼻疽伯克霍尔德菌,在血培养系统中进行 5 天标准化孵育后均可被检出,所以不需要裂解离心和延长孵育时间等特殊血培养技术。使用选择性培养基有助于从含混合微生物群的标本中分离这些细菌。除了泡囊短波单胞菌外,这些属的大多数菌种都可以用麦康凯琼脂进行分离培养。

伯克霍尔德菌属菌种可在麦康凯琼脂上生长(图 45-2a),但使用可抑制铜绿假单胞菌生长的特定选择性培养基,能更好地分离洋葱伯克霍尔德菌复合群和类鼻疽伯克霍尔德菌。目前,曾经报道过的一些选择性培养基部分已商品化。有关

3 种培养基的多中心研究表明，在 PC（洋葱假单胞菌）琼脂（BD Diagnostics，Franklin Lakes，NJ）[137]、OFPBL（氧化-发酵底物-多黏菌素 B-杆菌肽-乳糖）琼脂（BD Diagnostics）[138] 和 BCSA（洋葱伯克霍尔德菌选择性琼脂，Hardy Diagnostics，Santa Maria，CA）[26] 中，BCSA 效果最佳，比 PC 或 OFPBL 琼脂更敏感（洋葱伯克霍尔德菌分离率更高），且更特异（其他种类微生物生长更少）[26,139]。通过分析 142 株包括所有洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种的临床或环境分离菌株，对 TB-T（台盼蓝-四环素）、PC-AT（洋葱假单胞菌壬二酸）和 BCSA[26,139] 培养基与 3 种商品化培养基，即 Mast Diagnostics 公司（Bootle，Merseyside，United Kingdom）、LAB M 有限公司（Bury，United Kingdom）和 Oxoid 有限公司（Basingstoke，United Kingdom）的洋葱伯克霍尔德菌培养基进行敏感性对比[140]，发现 BCSA 和 Mast 公司的培养基能更好地支持洋葱伯克霍尔德菌复合群分离株生长。另一项研究评估了使用这 2 种培养基从 CF 患者痰标本中分离洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种的敏感性和特异性[141]，结果显示，BCSA 和 Mast 培养基敏感性相同，但前者选择性更佳。

Ashdown 培养基能有效分离类鼻疽伯克霍尔德菌（图 45-2），其选择性成分为结晶紫和庆大霉素。从含有混合菌群的临床标本（包括咽拭子、直肠拭子和痰）中分离类鼻疽伯克霍尔德菌时，该培养基优于麦康凯琼脂和添加多黏菌素的麦康凯琼脂[142]。有报道称一种替代的 BPSA（即类鼻疽伯克霍尔德菌选择性琼脂）比其他培养基能更好地分离培养类鼻疽伯克霍尔德菌[143]，但这种培养基并未商品化。由于 BPSA 能更好地抑制铜绿假单胞菌和洋葱伯克霍尔德菌复合群的生长，伯克霍尔德菌属的其他菌种因独特的菌落形态而更容易识别。一项对 BPSA、Ashdown 培养基和洋葱伯克霍尔德菌培养基的临床对比研究显示，三者分离类鼻疽伯克霍尔德菌的敏感性相同，但 BPSA 的选择性低于后两者[144]。洋葱伯克霍尔德菌培养基已广泛使用，当无法获得 Ashdown 培养基时，它是一个不错的替代品。一种含有 Ashdown 成分并添加 50 mg 多黏菌素的肉汤增菌培养基优于标准增菌培养基，如胰蛋白酶大豆肉汤，且相对于 Ashdown 固体培养基，它能提高采集于定植部位的临床标本中类鼻疽伯克霍尔德菌的分离率[121]。在 37℃空气环境孵育 48 h 后，选择性肉汤培养物应接种于 Ashdown 固体培养基进行传代培养，因延长孵育时间能使某些菌落易于肉眼观察，故所有接种的平板应在 37℃空气环境下培养 4 天，并在丢弃之前每日观察平板。

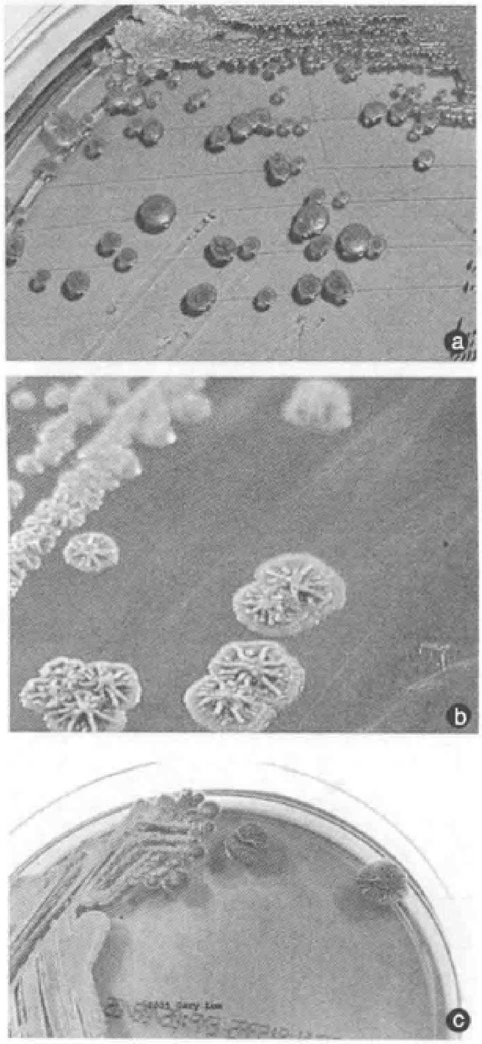


图 45-2　a. 麦康凯平板上类鼻疽伯克霍尔德菌菌落；b. 血平板上类鼻疽伯克霍尔德菌菌落；c. Ashdown 平板上类鼻疽伯克霍尔德菌菌落，见彩插

使用选择性培养基可提高临床和环境标本中嗜麦芽窄食单胞菌的分离率。Denton 等[145] 对加入万古霉素、亚胺培南和两性霉素 B 的选择性培养基（VIA 培养基）分离 CF 患儿痰标本中嗜麦芽窄食单胞菌的敏感性进行了研究。该研究比较了 VIA 培养基和现有的自制培养基，后者即在杆菌肽-巧克力琼脂上放置一张亚胺培南纸片。结果显示，使用 VIA 作为选择性培养基时检出率更高。

八、鉴定

(一)洋葱伯克霍尔德菌复合群与唐菖蒲伯克霍尔德菌

目前,洋葱伯克霍尔德菌复合群所有菌种的准确鉴定仍是一个挑战。此前很多商品化的细菌鉴定系统都无法将洋葱伯克霍尔德菌复合群内的这些菌种进行明确区分,也常不能将这些菌种与其他相近的种属如唐菖蒲伯克霍尔德菌、罗尔斯顿菌属、贪铜菌属及潘多拉菌属菌种相鉴别[77,105,146],这给 CF 患者及其医护人员带来极大的困扰,详细内容见前述的“临床意义”。CF 患者痰培养中分离鉴定到洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种对于患者的医疗处置、预后及肺移植指征具有重要影响,而且也会引起 CF 患者明显的焦虑情绪。因此,当使用商品化表型检测系统从 CF 患者的临床标本中初步鉴定出伯克霍尔德菌属、罗尔斯顿菌属、贪铜菌属或者潘多拉菌属菌种时,需要使用可信度更高的方法对鉴定结果加以确证。为协助美国临床微生物学家,CF 基金会建立了一个洋葱伯克霍尔德菌参考实验室,此参考实验室采用表型和基因型相结合的方法(见下文)对疑似洋葱伯克霍尔德菌复合群分离株及从 CF 患者呼吸道标本中分离到的其他非发酵菌进行确证[147]。更多相关信息和专长于伯克霍尔德菌属的其他参考实验室可查询CF 基金会网站(http://www.cff.org)。

洋葱伯克霍尔德菌复合群细菌大约需要培养 3 天才能在选择性培养基上出现肉眼可见的菌落。在麦康凯或者 M-H 琼脂平板上,菌落呈点状且黏着力强。在血平板或者 BCSA、PC 和 OFPBL 等选择性培养基上,菌落则较平滑,略突起,极少数可呈黏液状。延长培养时间(4~7 天),由于乳糖氧化作用,洋葱伯克霍尔德菌复合群在麦康凯平板上的菌落常呈暗粉色至红色。大多数临床分离株都不产生色素,但是在含铁培养基,如三糖铁斜面,许多菌株会产生亮黄色色素。洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种还有一种特征性的污泥气味。

洋葱伯克霍尔德菌复合群内的各个菌种在表型上非常相似,即使补充生化试验(表 45-1)也难以鉴别这些菌种且这些菌种的分离株在某些表型上有一定的变异,这很大程度上是由于它们异常庞大的基因组上含有丰富的插入序列和可移动元件(如质粒、转座子和噬菌体)[148]。这些特征可导致遗传的可塑性及多样性,当它们差异表达时,分离株则表现出多样化的生化谱型。尽管某些污染伯克霍尔德菌、广泛伯克霍尔德菌和吡咯菌素伯克霍尔德菌菌株氧化酶阴性,但是洋葱伯克霍尔德菌复合群中的大多数菌株氧化酶呈弱阳性。多食伯克霍尔德菌、假多食伯克霍尔德菌、稳定伯克霍尔德菌及欺瞒伯克霍尔德菌极少氧化蔗糖。稳定伯克霍尔德菌与大多数新洋葱伯克霍尔德菌一样,鸟氨酸脱羧酶阳性,但不同的是,前者有 2/3 以上的菌株邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG)试验阴性。稳定伯克霍尔德菌、广泛伯克霍尔德菌及大多数双向伯克霍尔德菌在 42℃条件下生长不良。欺瞒伯克霍尔德菌常表现为赖氨酸脱羧酶阴性,而仅约半数的多食伯克霍尔德菌为阴性,洋葱伯克霍尔德菌复合群中的其他菌种通常为赖氨酸脱羧酶阳性。越南伯克霍尔德菌、潟湖伯克霍尔德菌及大多数花园伯克霍尔德菌菌株均不能氧化核糖醇。花园伯克霍尔德菌除了能利用蔗糖外,在 BCSA 上的菌落呈特征性奶油状,有时也可变为粉红色(如碱性环境)[13]。

洋葱伯克霍尔德菌复合群与唐菖蒲伯克霍尔德菌及潘多拉菌属菌种在表型上也不易区分(表 45-1)。细胞脂肪酸分析并不能区别洋葱伯克霍尔德菌复合群和唐菖蒲伯克霍尔德菌[149]。与洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种不同,大多数唐菖蒲伯克霍尔德菌菌株氧化酶为阴性,大多数洋葱伯克霍尔德菌复合群菌株均可氧化麦芽糖和乳糖,而唐菖蒲伯克霍尔德菌通常无法氧化这 2 种糖类。潘多拉菌属菌种不能氧化分解麦芽糖、乳糖、木糖、蔗糖及核糖醇,且大多数菌株 ONPG 呈阴性。洋葱伯克霍尔德菌复合群与罗尔斯顿菌属及贪铜菌属的鉴别也较为困难,然而,后两者部分菌种氧化酶反应快速且强烈,而洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种的氧化酶反应则缓慢而呈弱阳性。而且,与大多数洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种不同,罗尔斯顿菌属和贪铜菌属赖氨酸脱羧酶为阴性,且通常大多数菌株 ONPG 呈阴性。

表 45-1 洋葱伯克霍尔德菌复合群、唐菖蒲伯克霍尔德菌和潘多拉菌属菌种的特征[a]

试验	洋葱伯克霍尔德菌复合群																				唐菖蒲伯克霍尔德菌	潘多拉菌属菌种
	双向伯克霍尔德菌	花园伯克霍尔德菌	森林伯克霍尔德菌	新洋葱伯克霍尔德菌	洋葱伯克霍尔德菌	污染伯克霍尔德菌	扩散伯克霍尔德菌	欺瞒伯克霍尔德菌	广泛伯克霍尔德菌	隐蔽伯克霍尔德菌	金属伯克霍尔德菌	多食伯克霍尔德菌	假多食伯克霍尔德菌	吡咯菌素伯克霍尔德菌	种子伯克霍尔德菌	稳定伯克霍尔德菌	潟湖伯克霍尔德菌	领地伯克霍尔德菌	乌汶伯克霍尔德菌	越南伯克霍尔德菌		
氧化酶[b]	+	+	+	+	+	V	+	+	V	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	V	V
生长																						
麦康凯[c]	+	+	+	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+
BCSA[b]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	V
42℃[c]	V	V	V	V	V	V	V	+	−	+	+	+	+	V	+	−	V	+	V	+	−	V
黄色色素[c]	V	−	V	−	V	V	−	−	V	−	V	−	−	V	V	−	−	−	−	−	V	−
棕色色素[c]	−	−	−	V	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	V	−
溶血[d]	Vβ	−	Vβ	−	−	V	−	−	−	−	−	−	−	Vβ	−	−	Vβ	−	−	Vβ		
产酸[e]																						
麦芽糖[c]	+	+	+	V	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	−	−
乳糖[b]	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	−	−
D-木糖[c]	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	V	+	−
蔗糖[b]	+	V	V	+	V	+	V	−	V	+	V	−	−	V	V	−	V	V	+	+	−	−
核糖醇[c]	+	V	+	V	V	+	V	+	V	+	+	+	V	+	+	+	−	+	−	−	+	−
硝酸盐还原[c,f]	V	V	V	V	−	V	+	+	V	−	−	+	V	V	−	−	−	V	V	V	V	V
赖氨酸脱羧酶[b]	+	V	V	+	+	+	+	−	+	+	+	V	+	+	V	+	+	+	−	+	−	−
鸟氨酸脱羧酶[c]	−	−	+	V	V	−	−	−	V	−	−	−	−	V	V	+	−	−	−	−	−	−
七叶苷水解酶[c,f]	V	−	−	V	V	V	−	−	V	−	+	−	−	−	V	−	−	−	−	−	V	−
明胶酶[c,f]	+	−	+	V	V	+	V	−	V	V	+	−	−	V	+	+	V	+	+	−	V	−
PNPG 或 ONPG[b,g]	+	V	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	V	+	+	−	+	+	V

注：[a]+. >90%的菌株阳性；V. 10%～90%阳性；−. <10%阳性。[b] 每种细菌的试验株数：双向伯克霍尔德菌，51；花园伯克霍尔德菌，24；森林伯克霍尔德菌，16；新洋葱伯克霍尔德菌，928；洋葱伯克霍尔德菌，181；污染伯克霍尔德菌，54；扩散伯克霍尔德菌，16；欺瞒伯克霍尔德菌，57；广泛伯克霍尔德菌，25；隐蔽伯克霍尔德菌，6；金属伯克霍尔德菌，7；多食伯克霍尔德菌，715；假多食伯克霍尔德菌，11；吡咯菌素伯克霍尔德菌，85；种子伯克霍尔德菌，19；稳定伯克霍尔德菌，73；潟湖伯克霍尔德菌，8；领地伯克霍尔德菌，4；乌汶伯克霍尔德菌，2；越南伯克霍尔德菌，145；唐菖蒲伯克霍尔德菌，280；潘多拉菌属，75。数据来自参考文献[13][105][154]和[250]，以及 J. J. LiPuma(未发表)和 D. A. Henry(未发表)。[c] 每种细菌的试验株数：双向伯克霍尔德菌，18；花园伯克霍尔德菌，16；森林伯克霍尔德菌，13；洋葱伯克霍尔德菌，23；新洋葱伯克霍尔德菌，139；污染伯克霍尔德菌，7；扩散伯克霍尔德菌，6；欺瞒伯克霍尔德菌，12；广泛伯克霍尔德菌，11；隐蔽伯克霍尔德菌，6；金属伯克霍尔德菌，3；多食伯克霍尔德菌，109；假多食伯克霍尔德菌，11；吡咯菌素伯克霍尔德菌，5；种子伯克霍尔德菌，13；稳定伯克霍尔德菌，27；潟湖伯克霍尔德菌，8；领地伯克霍尔德菌，4；乌汶伯克霍尔德菌，2；越南伯克霍尔德菌，36；唐菖蒲伯克霍尔德菌，27；潘多拉菌属，9。数据来自文献[13]、[105]、[154]和[250]和 D. A. Henry(未发表)。[d] 羊血细胞溶血；β，β溶血。[e] 孵育 2～7 天后记录氧化酶试验结果。[f] 结果来自 API 20NE 试验条。[g]PNPG. 对硝基苯-β-D-吡喃葡糖苷

通过表型对洋葱伯克霍尔德菌复合群内各菌种间进行鉴别难度较大，这一挑战促进了分子遗传学诊断技术的发展，从而使这些菌种能鉴定到种水平，并将它们(作为一个群)与一些生化反应相似的菌种相区分。利用 16S rRNA 和 23S rRNA 基因序列差异建立的种特异性 PCR 方法可对洋葱伯克霍尔德菌复合群内某些菌种[147,150]及唐菖蒲伯克霍尔德菌[151]进行鉴定。采用 16S rRNA 靶基因的检

测方法可以可靠地鉴定多食伯克霍尔德菌、越南伯克霍尔德菌及欺瞒伯克霍尔德菌，但因rRNA基因序列变异性不足，洋葱伯克霍尔德菌复合群内其余菌种则不能准确区分。幸运的是，*recA*基因存在种特异性序列变异，以此位点为靶基因的PCR方法可准确鉴定临床标本中最常见的洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种[152-156]。另外一些文献报道的其他基于16S rRNA和*recA*的PCR方法能够鉴定所有伯克霍尔德菌属菌种（属水平）或洋葱伯克霍尔德菌复合群内所有菌种（作为一个群）[147,153,157]。

其他用于鉴定洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种的分子遗传学方法还包括对16S rRNA或*recA*基因进行限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism，RFLP）分析[153]。同样，即便应用多重限制性内切酶，16S rRNA基因序列变异性不足仍会限制该位点上RFLP分析方法的应用[158]。相比之下，有研究证明基于*recA*基因的RFLP分析方法有益于准确鉴别洋葱伯克霍尔德菌复合群内所有菌种[153-157]。

尽管洋葱伯克霍尔德菌复合群的多位点序列分型（multilocus sequence typing，MLST）方法在建立之初仅用于这些菌种的流行病学和种群遗传学结构分析[159]，但同时该方法也提供了另外一种鉴定复合群内各个菌种的途径，这种方法改良后可用于伯克霍尔德菌属内所有菌种的分型[160]。其他的基因组学方法，包括扩增片段长度多态性分型、核糖体分型及全细胞蛋白质谱分析等，也建议用于鉴别洋葱伯克霍尔德菌复合群内的不同菌种[161-163]。然而，这些方法耗时、昂贵，并且在菌株准确鉴定之前还需建立一个规模较大且已被验证的数据库，上述局限性使得这些方法不适用于常规诊断实验室。细胞脂肪酸甲酯分析有助于伯克霍尔德菌属菌株鉴定至属水平，但是它对洋葱伯克霍尔德菌复合群内个别菌种的鉴定并不可靠，而且不能与唐菖蒲伯克霍尔德菌相区别[22]。

采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）鉴定伯克霍尔德菌复合群菌种的可靠性和分辨力因待测菌种和所使用数据库的不同而存在较大差异[164-169]。通常，评估MALDI-TOF MS对伯克霍尔德菌复合群（本章中所提及的其他菌种）鉴定能力的研究纳入的菌株数较少，而且也没有对20个菌种均进行评估。Desai等[168]发现，与基因分型方法相比，MALDI-TOF MS能够将29株分属于伯克霍尔德菌复合群内6个菌种的分离株准确地鉴定到属水平，其中仅24株准确鉴定到种水平。最近，Plongla等[170]的研究显示，MALDI-TOF MS能够准确地鉴定本试验所测试的所有常见菌株，包括多食伯克霍尔德菌（$n=10$）、越南伯克霍尔德菌（$n=8$）、污染伯克霍尔德菌（$n=12$）及唐菖蒲伯克霍尔德菌（$n=10$），其他较不常见的伯克霍尔德菌复合群菌种的鉴定准确率在64%～95%。从分离自人类和环境标本的"洋葱伯克霍尔德菌样"菌株中鉴定出的伯克霍尔德菌属新菌种[如近期发现的潟湖伯克霍尔德菌、领地伯克霍尔德菌、*B. catarinensis*和*B. puraquae*（译者注：上述2个拉丁名没有中文译名）][13,171,172]似乎呈现不断增多趋势，这也给基于表型的分析方法带来持续挑战。最后，虽然MALDI-TOF MS的应用缩短了TAT时间（与DNA测序分析方法或与移交参考实验室相比），但值得注意的是，CF患者呼吸道定植新的机会病原菌时，患者通常是无症状的，也没有必要立刻更改临床处理（抗菌药物治疗方案或感染控制措施），故分离培养出的菌种的准确鉴定比快速鉴定显得更为重要。

(二)类鼻疽伯克霍尔德菌和鼻疽伯克霍尔德菌

类鼻疽伯克霍尔德菌在血平板上生长48 h后，菌落通常较小，光滑，呈奶油状；继续孵育，菌落变干，变皱。类鼻疽伯克霍尔德菌在Ashdown琼脂平板上生长18 h后菌落非常小（针尖状），培养48 h后通常呈紫色、扁平、干燥、皱缩（"向日葵头"）（图45-2c）。该菌动力阳性，吲哚试验阴性，氧化酶阳性，并且对多黏菌素和庆大霉素耐药，这些特点有助于此种细菌的鉴定。其他典型的生化反应见表45-2。这些基本特征难以区分泰国伯克霍尔德菌与类鼻疽伯克霍尔德菌，但是可以根据阿拉伯糖同化作用进行鉴别，泰国伯克霍尔德菌能够利用L-阿拉伯糖作为唯一的碳源，而类鼻疽伯克霍尔德菌和鼻疽伯克霍尔德菌均无此特性[173]。临床标本中极少检出泰国伯克霍尔德菌，人类感染泰国伯克霍尔德菌且菌种已确证的病例报道仅涉及一例患者[174]（译者注：此处参考文献[174]引用有误）。鼻疽伯克霍尔德菌在人类临床

标本中也极为罕见，且可能与类鼻疽伯克霍尔德菌和泰国伯克霍尔德菌相混淆。当怀疑或需要排除鼻疽伯克霍尔德菌时，可利用以下 2 个特性加以鉴别：①鼻疽伯克霍尔德菌无动力，而类鼻疽伯克霍尔德菌和泰国伯克霍尔德菌有动力；②鼻疽伯克霍尔德菌对庆大霉素敏感，而其他 2 种菌对其天然耐药。后者容易导致经验不丰富的微生物学技术人员误判，因为 Ashdown 培养基通常含有庆大霉素而不支持鼻疽伯克霍尔德菌生长。细胞脂肪酸谱能够将类鼻疽伯克霍尔德菌与其他菌属细菌相区别，但一些报道发现，该方法区分泰国伯克霍尔德菌和类鼻疽伯克霍尔德菌[175]或其他伯克霍尔德菌属病原菌（包括鼻疽伯克霍尔德菌、洋葱伯克霍尔德菌复合群及唐菖蒲伯克霍尔德菌）的结果不尽相同。

表 45-2 鼻疽伯克霍尔德菌、类鼻疽伯克霍尔德菌和泰国伯克霍尔德菌的特征[a]

试验	鼻疽伯克霍尔德菌	类鼻疽伯克霍尔德菌	泰国伯克霍尔德菌
氧化酶	v	+	+
生长			
麦康凯	+	+	+
42℃	−	+	+
硝酸盐还原	+	+	+
硝酸产气	−	+	+
精氨酸双水解酶	+	+	+
赖氨酸脱羧酶	−	−	−
鸟氨酸脱羧酶	−	−	−
水解			
尿素	v	v	v
柠檬酸盐	−	v	v
明胶	−	v	v
七叶苷	−	v	v
产酸			
葡萄糖	+	+	+
木糖	v	+	+
乳糖	v	+	+
蔗糖	−	v	v
麦芽糖	−	+	+
甘露醇	−	+	+
阿拉伯糖	ND	−	+
动力(%)[b]	0	100	100
鞭毛数量	0	≥2	≥2

注：[a] 数据来源于参考文献[193]。+. >90%的菌株阳性；−. <10%阳性；v. 10%～90%阳性；ND. 未确定。[b]0. 动力均阴性；100. 动力均阳性

目前，已有多项研究评估了 API 20NE 鉴定类鼻疽伯克霍尔德菌的准确率，这些报道显示菌株鉴定正确率为 37%～99%[174,176-180]。造成研究结果间差异的一个可能原因是，来自不同地区和（或）不同来源（临床与环境）的类鼻疽伯克霍尔德菌分离株表型差异明显。其中一项大样本研究显示，API 20NE 对类鼻疽伯克霍尔德菌分离株的鉴定正确率达到 99%[176]，该项研究收集了大量（$n=800$）分离自临床病例、环境及动物标本的类鼻疽伯克霍尔德菌菌株，研究范围涉及亚洲 7 个国家和澳大利亚北部，为 API 20NE 应用于类鼻疽伯克霍尔德菌的鉴定提供了依据。但 API 20NE 不能鉴定鼻疽伯克霍尔德菌或泰国伯克霍尔德菌[176]。全自动 VITEK 1 系统可准确鉴定类

鼻疽伯克霍尔德菌[180]。2项关于VITEK 2 GN比色卡的评估报告显示，其对类鼻疽伯克霍尔德菌鉴定的准确率约为80%，最常见的错误是把该菌种鉴定为洋葱伯克霍尔德菌菌群[177,181]。据报道，VITEK 2鉴定的准确率受测试前分离类鼻疽伯克霍尔德菌所用培养基类型的影响，哥伦比亚马血平板上生长的菌落鉴定准确率最高[181]。另一项研究显示，地域差异也能影响VITEK 2鉴定的准确率[182]。一项关于MALDI-TOF MS对伯克霍尔德菌属菌种鉴定准确率的评估报道显示，MALDI-TOF MS能准确鉴定类鼻疽伯克霍尔德菌，但可能把泰国伯克霍尔德菌错误地鉴定为类鼻疽伯克霍尔德菌[183]，考虑其原因是受质谱参考数据库所限。在后续一项研究中，研究者建立了参考质谱图库，而后评估了全细胞MALDI-TOF MS方法鉴定鼻疽伯克霍尔德菌和类鼻疽伯克霍尔德菌的性能[184]，应用专用亚组的参考谱库可鉴定这2种菌。最近一项大型研究证实MALDI-TOF MS能够准确鉴定类鼻疽伯克霍尔德菌，还能将其与鼻疽伯克霍尔德菌进行区分[185]。当分离到鼻疽伯克霍尔德菌或类鼻疽伯克霍尔德菌疑似或确证菌株时，建议提交参考实验室。随着许多国家立法应对新兴生物恐怖，这一建议显得尤为重要(见第15章)。

分离自临床标本的类鼻疽伯克霍尔德菌必须与施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)和洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种相鉴别。孵育数天后，施氏假单胞菌与类鼻疽伯克霍尔德菌的表型非常相似，而类鼻疽伯克霍尔德菌和洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种都能分离自CF患者[83,186]。但是，类鼻疽伯克霍尔德菌能够利用硝酸盐产生气体，并且精氨酸双水解酶为阳性，而绝大多数洋葱伯克霍尔德菌复合群内的分离株不具有上述2个特征。施氏假单胞菌精氨酸双水解酶为阴性，不能氧化发酵葡萄糖和水解明胶。施氏假单胞菌仅有一根鞭毛，而类鼻疽伯克霍尔德菌的鞭毛不止一根。

(三)罗尔斯顿菌属与贪铜菌属

尽管皮氏罗尔斯顿菌曾被认为是临床标本中分离率最高的罗尔斯顿菌属菌种，但最近发现，从皮氏罗尔斯顿菌样细菌分离株中可鉴定到一些其他的罗尔斯顿菌属和贪铜菌属菌种，因此，之前的观察结果值得商榷。与洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种的情况类似，罗尔斯顿菌属和贪铜菌属菌种在表型上非常相近，需要大量的生化试验才能可靠地加以区分，仅采用标准的生化试验对其进行种水平的鉴定较为困难(表45-3)。这些菌种在初代分离培养基上生长缓慢，需要孵育≥72 h才能出现肉眼可见的菌落。它们赖氨酸脱羧酶阴性，触酶通常阳性，尽管曾有皮氏罗尔斯顿菌分离株触酶阴性的报道[22-23]。大多数菌种的氧化酶反应快速且强烈，但解甘露醇罗尔斯顿菌、皮氏罗尔斯顿菌和吉拉迪贪铜菌的氧化酶反应强度存在差异，一些菌株仅呈现弱阳性[22,23](LiPuma，未发表)。皮氏罗尔斯顿菌、解甘露醇罗尔斯顿菌和危险罗尔斯顿菌能在BCSA上生长，而大多数贪铜菌属菌株不能生长，其生长与否和菌株本身的特性有关。这些菌种不能利用蔗糖产酸。大多数解甘露醇罗尔斯顿菌能发酵乳糖产酸，而其他菌种的大多数菌株则不能发酵乳糖产酸。危险罗尔斯顿菌、呼吸道贪铜菌、吉拉迪贪铜菌和*C. paucula*[译者注：应为少见贪铜菌(*C. pauculus*)]不能发酵葡萄糖产酸，而皮氏罗尔斯顿菌和解甘露醇罗尔斯顿菌可以发酵葡萄糖产酸。贪铜菌属菌种具有不同于其他罗尔斯顿菌属菌种的特征性细胞脂肪酸谱[20,23]。这些菌种的主要脂肪酸组成是$C_{16:0}$、$C_{16:1\ \omega7c}$及$C_{18:1\ \omega7c}$(每种占总脂肪酸含量的20%～30%)，另外，也常有$C_{14:0}$、$3OHC_{14:0}$及$C_{17:0}$ cyclo结构出现(每种占总脂肪酸含量的5%～10%)[24,187]。

采用分子遗传学检测方法能可靠地鉴别这些菌种。16S rRNA靶向PCR试验能够可靠鉴定所有罗尔斯顿菌属和贪铜菌属菌种(作为同一群)，并使它们与伯克霍尔德菌属和潘多拉菌属内表型相近的菌种得以区分[106]。有学者已建立了基于16S rRNA种特异性PCR方法，该方法可以准确鉴定皮氏罗尔斯顿菌、解甘露醇罗尔斯顿菌、危险罗尔斯顿菌和呼吸道贪铜菌[24,106,188]。有报道称MALDI-TOF MS对少数罗尔斯顿菌属菌种的鉴定能力差异较大[169-170,189]。

表 45-3 罗尔斯顿菌属和贪铜菌属菌种的特征[a]

试验	皮氏罗尔斯顿菌	解甘露醇罗尔斯顿菌	危险罗尔斯顿菌	呼吸道贪铜菌	吉拉迪贪铜菌	少见贪铜菌
触酶	v	+	+	+	+	+
氧化酶	+	+	+	+	+	+
生长						
BCSA	+	+	+	−	−	v
42℃	v	+	ND	ND	+	v
多黏菌素耐药	+	+	ND	ND	ND	−
硝酸盐还原	+	−	+	v	−	−
吐温 80 水解	+	+	ND	ND	−	+
脲酶	+	+	v	−	−	+
赖氨酸脱羧酶	−	−	−	−	−	−
ONPG	−	v	v	−	v	ND
产酸						
L-阿拉伯糖	+	+	ND	ND	−	−
D-阿拉伯糖醇	−	+	ND	ND	ND	−
葡萄糖	+	+	−	−	−	−
肌醇	−	−	ND	ND	ND	−
乳糖	v	+	v	−	−	−
麦芽糖	v	+	ND	ND	ND	−
甘露醇	−	+	ND	ND	ND	−
蔗糖	−	−	−	−	−	−
木糖	+	+	ND	ND	−	−
动力	+	+	ND	ND	+	+
鞭毛	1 根极生鞭毛	1 根极生鞭毛	ND	ND	1 根极生鞭毛	周边毛

注：[a] 数据来源于参考文献[20-23]，以及 J. J. LiPuma(未发表)。+. ≥90%的分离株阳性；−. <10%的分离株阳性；v. 10%～90%阳性；ND. 未确定

(四)潘多拉菌属

总体而言，潘多拉菌属菌株与分离自临床标本的伯克霍尔德菌属和罗尔斯顿菌属菌株的生化特性相似(表 45-1)[6,105,119]。潘多拉菌属的特征是缺乏糖分解能力，但是某些罗尔斯顿菌属菌种也同样缺乏此能力。疑似潘多拉菌属分离株的准确鉴定需采用分子生物学方法进行确认。Coenye 等[190]曾报道采用 16S rDNA 的 PCR 方法鉴定这些细菌。目前，已建立了一种将潘多拉菌属分离株鉴定到属水平的 PCR 方法。用于鉴定奸诈潘多拉菌和居肺潘多拉菌(作为同一群)、留肺潘多拉菌、痰潘多拉菌和纽伦堡潘多拉菌等菌种的 PCR 方法也已建立。潘多拉菌属菌株可以通过其特异的 16S rDNA 基因限制性图谱与伯克霍尔德菌属和罗尔斯顿菌属菌株相鉴别[105,191]，也可通过 *gyrB* 基因的 MspI限制性酶分析鉴定到种水平[192]。定量比较这 3 个菌属成员的全细胞脂肪酸谱，可以将潘多拉菌属与其他菌属细菌予以区分[23,119]。然而，当使用商品化微生物鉴定系统的数据库(Microbial ID, Inc.，Newark，DE)时，由于缺乏特异性的脂肪酸数据，这些细菌大多以低鉴定分值被鉴定为伯克霍尔德菌属或罗尔斯顿菌属菌种[23,105]。不同文献报道显示 MALDI-TOF MS 对潘多拉菌属菌种鉴定的准确率有所差异[169-170,189]。

(五)嗜麦芽窄食单胞菌

嗜麦芽窄食单胞菌鉴定要点包括氧化葡萄糖和麦芽糖(后者反应更强烈)、DNA 酶和赖氨酸脱羧酶反应阳性及束状极生鞭毛(表 45-4)[193]。尽管最初认为大多数菌株氧化酶阴性，但是通过测试大量分离自人体标本并提交给参考实验室的菌

株后发现，约 20%菌株可能氧化酶阳性[194]。由于表型“不典型”的菌株可能会优先检测，所以这个比例可能比预期高。检测胞外 DNA 酶活性是鉴别嗜麦芽窄食单胞菌与其他绝大多数可氧化葡萄糖的革兰阴性杆菌的关键试验，可通过含甲基绿指示剂的 DNA 酶培养基(试管或平板)进行检测。曾有 1 例将嗜麦芽窄食单胞菌错误地鉴定为洋葱伯克霍尔德菌的报道，其部分原因是菌株仅培养 48 h 而非 72 h，造成了 DNA 酶反应假阴性[195]，所以在解释 DNA 酶反应结果时需谨慎。部分黄杆菌属(*Flavobacterium*)和希瓦菌属(*Shewanella*)某些种的 DNA 酶也可能阳性(见第 46 章)。在羊血琼脂平板上，嗜麦芽窄食单胞菌的菌落较粗糙，呈淡紫绿色，且有氨味。该菌具有特征性的细胞脂肪酸谱，含有大量(>30%)的 13-甲基十四烷酸($C_{15:0}$iso)及较少(>10%)的 12-甲基十四烷酸($C_{15:0}$anteiso)和顺-9-十六碳烯酸($C_{16:1}$*cis*9)[193]。

为解决嗜麦芽窄食单胞菌准确鉴定的难题，Whitby 等[196]建立了一种以 23S rRNA 基因为靶位的种特异性 PCR 方法，其敏感性和特异性均为 100%。这项 PCR 试验可作为评价 API 20NE 板条和 VITEK 2 ID-GNB 卡鉴定嗜麦芽窄食单胞菌的标准方法[197]。与 PCR 方法相比，这 2 种系统都具有良好的可靠性。已有文献报道，采用多重 PCR 方法可直接鉴定 CF 患者痰和口咽部标本中的铜绿假单胞菌、洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种和嗜麦芽窄食单胞菌，但嗜麦芽窄食单胞菌的检测株数相当有限。最初，MALDI-TOF MS 对嗜麦芽窄食单胞菌的鉴定能力差异较大[189,198]，但目前，美国已批准其可用于该菌的鉴定。与本章所提及的其他非发酵型机会致病菌一样，由于人们对窄食单胞菌属分类学了解不完全，临床和环境分离株的准确鉴定仍面临挑战。

表 45-4 分离自临床标本的食酸菌属、短波单胞菌属、代尔夫特菌属、丛毛单胞菌属和窄食单胞菌属菌种的特征[a]

试验	德氏食酸菌 (n=2)	敏捷食酸菌 (*A. facilis*) (n=2)	温和食酸菌 (n=2)	缺陷短波单胞菌 (n=68)	泡囊短波单胞菌 (n=94)	食酸代尔夫特菌 (n=69)	丛毛单胞菌属 (n=28)	嗜麦芽窄食单胞菌 (n=228)
氧化酶[b]	100	100	100	100	98	100	100	20
生长								
麦康凯	100	0	100	100	43	100	100	100
溴棕三甲铵	0	0	0	0	0	4	0	2
6.0%氯化钠	0	0	0	21	23	6	0	22
42℃	50	0	100	38	19	29	68	48
硝酸盐还原	100	100	100	3	5	99	96	39
硝酸盐产气	0	0	100	0	0	0	0	0
色素	黄色，可溶	无	黄色，可溶	棕色-褐色，可溶	52%黄色-橙色，不可溶[c]	26%荧光，44%黄色-褐色，可溶	27%黄色-棕色，可溶	棕色-褐色，可溶
精氨酸双水解酶	100	100	0	0	0	0	0	0
赖氨酸脱羧酶	0	0	0	0	0	0	0	93
鸟氨酸脱羧酶	0	0	0	0	0	0	0	0
吲哚	0	0	0	0	0	0	0	0
溶血	0	0	0	0	0	0	0	1
水解								
尿素	100	100	50	13	2	0	7	3
柠檬酸盐	100	0	0	1	1	94	47	34
明胶	0	100	0	68	25	11	0	93
七叶苷	0	0	0	5	88	0	0	39

（续 表）

试验	德氏食酸菌（n=2）	敏捷食酸菌（*A. facilis*）（n=2）	温和食酸菌（n=2）	缺陷短波单胞菌（n=68）	泡囊短波单胞菌（n=94）	食酸代尔夫特菌（n=69）	丛毛单胞菌属（n=28）	嗜麦芽窄食单胞菌（n=228）
产酸								
葡萄糖[d]	100	100	100	21	87	0	0	85
木糖	85	100	0	0	27	0	0	35
乳糖	0	0	0	0	0	0	0	60
蔗糖	0	0	0	0	0	0	0	63
麦芽糖	0	0	0	0	94	0	0	100
甘露醇	50	100	50	0	0	100	0	0
H_2S[e]	100	100	100	34	49	57	0	95
动力	100	100	100	100	100	100	100	100
鞭毛数量	1～2	1～2	1～2	1～2	1～2	>2	>2	>2

注：[a] 数据来源于参考文献[193]。数值为阳性菌株的百分比，除非有其他标识。[b] BactiDrop 氧化酶（Remel，Dartford，Kent，United Kingdom）。[c] Thayer-Martin 培养基上观察到的色素。[d] 含 1%糖类的氧化-发酵基础培养基。[e] 醋酸铅试纸

（六）食酸菌属、短波单胞菌属、代尔夫特菌属和丛毛单胞菌属菌种

食酸菌属、短波单胞菌属、代尔夫特菌属和丛毛单胞菌属的特征见表 45-4。

食酸菌属菌种在临床或环境标本中极为少见，该属是直或微弯曲的革兰阴性杆菌，呈单个或短链状排列。它们氧化酶试验呈阳性，不产色素，含单根极生鞭毛。不同菌株之间脲酶活性存在差异[193]。

缺陷短波单胞菌和泡囊短波单胞菌在临床和环境标本中并不常见，它们的生长需要特殊的维生素，包括泛酸、生物素和维生素 B_{12}，缺陷短波单胞菌生长还需要半胱氨酸。大多数缺陷短波单胞菌能在麦康凯平板上生长，仅约 25%的泡囊短波单胞菌可在麦康凯平板上生长。在初代分离培养基上，缺陷短波单胞菌的菌落呈粉笔样白色，而泡囊短波单胞菌的大多数菌株可产生特征性的橙色胞内色素。这些细菌氧化酶阳性，极生鞭毛为单根，氧化葡萄糖能力弱（泡囊短波单胞菌比缺陷短波单胞菌稍强），且绝大多数不能将硝酸盐还原成亚硝酸盐。七叶苷水解试验是鉴别这 2 种细菌最可靠的方法。有报道显示，几乎所有（88%）的泡囊短波单胞菌菌株都能水解七叶苷，而极少数（5%）的缺陷短波单胞菌能够水解该底物（表 45-4）[193]。

丛毛单胞菌属菌种是直或微弯曲的革兰阴性杆菌，通常单个或成双排列。该属细菌触酶和氧化酶均阳性，有一簇束状极生鞭毛。所有分离自临床标本的丛毛单胞菌属菌种都能够将硝酸盐分解为亚硝酸盐。由于很难通过表型区分土生丛毛单胞菌和睾酮丛毛单胞菌，因此，分离株通常报告为丛毛单胞菌属某种（表 45-4）。

食酸代尔夫特菌在表型上与丛毛单胞菌属相似。该菌种的关键特征包括氧化果糖和甘露醇。1/4 的菌株可以产生荧光色素，而约 1/2 的菌株能产生可溶性黄色至褐色色素[27,193]。

九、分型系统

在院内或社区感染暴发的调查中，有数种分子遗传学方法能够评价这些种属分离株之间的亲缘关系，这些方法相对于表型分析系统更具优势，辨识度更高，重复性更好。诸多研究证实，采用脉冲场凝胶电泳（pulsed-field gel electrophoresis，PFGE）技术分析全基因组酶切图谱可以有效地对伯克霍尔德菌属、罗尔斯顿菌属和嗜麦芽窄食单胞菌等细菌进行分型[199-200]。XbaⅠ和 SpeⅠ是最常用的两种内切酶，通常能够得到大量可用于分析的 DNA 片段。然而，在解释伯克霍尔德菌属菌种的 PFGE 图谱时需谨慎，这些细菌具有异常庞大的、多变的多条染色体基因组，容易在 DNA 序列和位置上产生大规模的变异[201]，因而可能会在

短时间内出现与流行病学无关的基因组多态性，从而干扰暴发的调查[200]。核糖体分型是基于rRNA操纵子内部或周围序列多态性的一种分型方法，目前已用于洋葱伯克霍尔德菌复合群和类鼻疽伯克霍尔德菌的流行病学研究[202-204]。PFGE和核糖体分型技术相当耗时且成本较高，因而并不适用于临床微生物学实验室的常规分析。很多基于PCR的方法，包括随机扩增多态性DNA分型和重复序列PCR(repetitive-sequence PCR，rep-PCR)分型等，为嗜麦芽窄食单胞菌和伯克霍尔德菌属、罗尔斯顿菌属和潘多拉菌属菌种的基因分型提供了较好的替代方法[48,116,191,205-206]，这些方法既经济又能快速提供可靠的结果。MLST是对多个染色体位点上DNA序列多态性进行分析的方法，目前已建立了多个菌种，包括洋葱伯克霍尔德菌复合群、类鼻疽伯克霍尔德菌和鼻疽伯克霍尔德菌的MLST分型方法[159,207-209]。对洋葱伯克霍尔德菌复合群的MLST实验方案进行改良后可使之适用于该属所有菌种[160]。这种基因分型策略能够提供稳定、可重复、易于获得的结果，故它们很快成为细菌流行病学、进化及种群结构研究的首选方法。基于BOX A1R引物的重复序列片段PCR方法和多位点可变数目串联重复序列分析已用于排除类鼻疽伯克霍尔德菌同一克隆株的暴发[210-211]。目前，尚无有关短波单胞菌属、代尔夫特菌属、丛毛单胞菌属或食酸菌属菌种分型方法的报道。

十、血清学试验

本章所讨论的微生物，仅类鼻疽伯克霍尔德菌感染在临床上可采用血清学试验进行诊断。尽管间接血凝试验并无商品化试剂，但它仍是应用最广泛的检测手段。该方法用类鼻疽伯克霍尔德菌菌株抗原致敏的绵羊细胞进行检测，并以未致敏的细胞作为质控，可适用于微滴度板试验系统。近年还出现了一些诊断类鼻疽的血清学替代方法[212-214]。由于类鼻疽流行地区的健康人群血清学反应通常呈阳性，因而目前在该地区使用血清学试验的诊断价值有限[54,87,215]。血清学试验对于非类鼻疽流行区域定居人群具有潜在的应用价值，包括旅游回国人群和有类鼻疽伯克霍尔德菌意外暴露史的实验室工作人员[216]。间接血凝试验或其他血清学试验的结果解释较为复杂，这是由于：①尚无明确的指南；②判断暴露和急性感染期血清转换时，存在不同的cut off值。只要条件允许，应该进行配对样本检测，第2个样本出现血清转换现象即检测到类鼻疽伯克霍尔德菌抗体，则支持存在该菌暴露史。通常许多感染性疾病均采用滴度4倍增高作为诊断标准，但这尚未在类鼻疽诊断中得到证实，在2个样本之间任何可重复性的滴度升高都应认为是暴露的可能证据。可疑的暴露事件之后，具有相关旅行史的非流行区患者若出现单个样本滴度升高，即使配对血清的关联度小，仍提示存在暴露。有些患者已通过细菌培养确诊了类鼻疽，但其血清中并未检测到抗体[217]，故血清学试验阴性并不能排除存在暴露或类鼻疽的可能。目前有一种快速床旁抗原检测方法，其原理是侧流免疫层析，通过在试纸条上包被能够结合类鼻疽伯克霍尔德菌荚膜多糖的特异性单克隆抗体进行检测，该方法在检测痰、尿或脓液标本时效果较好，但用于检测血液标本时，其敏感性低于培养方法[128]。鉴于上述情况的复杂性，采用血清学诊断类鼻疽时应咨询该领域的专家。

十一、抗菌药物敏感性

特定的敏感性试验解释标准并不适用于本章讨论的所有种属细菌。对某些菌种，如洋葱伯克霍尔德菌和嗜麦芽窄食单胞菌等，纸片扩散法的解释标准仅适用于有限的几种抗生素。通常，MIC微量肉汤稀释法或E试验是这类微生物药物敏感性试验的首选方法。

洋葱伯克霍尔德菌复合群菌种是临床实验室中耐药谱较广的细菌之一。这些菌种对氨基糖苷类和多黏菌素天然耐药，并且通常由于染色体编码的诱导型β-内酰胺酶的产生和青霉素结合蛋白发生改变，从而对β-内酰胺类抗生素耐药[218-219]。抗生素外排泵可能介导其对氯霉素、氟喹诺酮及甲氧苄啶等耐药[220]。临床分离株可能仅对少数抗生素敏感，包括甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(TMP-SMX)、头孢他啶、米诺环素、碳青霉烯类及一些喹诺酮类药物[221]。甘氨酰环素类抗生素——替加环素的体外抗菌活性呈高度可变[222]。头孢洛扎/他唑巴坦和头孢他啶/阿维巴坦都是β-内酰胺类/β-内酰胺酶抑制剂的复合制剂，对这些菌种通常具有较好的体外抗菌活性[223-224]。大多数唐菖蒲伯克霍尔德菌菌株表现为相似的广谱耐药性，但例外的是，绝大部分

菌株对氨基糖苷类仍保持敏感[224]。

美国临床和实验室标准协会(CLSI)对洋葱伯克霍尔德菌复合群,推荐的纸片扩散法药敏试验解释标准适用于头孢他啶、美罗培南、米诺环素和TMP-SMX[225]。由于初始敏感的菌株可能在治疗过程中变为耐药菌,因此对分离株重复进行药敏试验是必要的。并且,在接受多疗程抗生素治疗的CF或者其他慢性肺疾病患者中,分离株常对目前可用的一种或多种抗菌药物耐药[84,221,226]。抗菌药物联合治疗耐药菌株感染可以发挥协同作用,但体外联合药敏试验的结果也可能提示存在拮抗作用[221]。

类鼻疽伯克霍尔德菌对青霉素、氨基糖苷类及大环内酯类天然耐药。常用于治疗类鼻疽的抗菌药物,如头孢他啶、亚胺培南或美罗培南、阿莫西林/克拉维酸、多西环素和TMP-SMX都需要进行药物敏感性试验[227]。从初始感染患者标本分离到的类鼻疽伯克霍尔德菌通常对上述抗菌药物均敏感。TMP-SMX纸片扩散法药敏试验会高估其耐药性且不可靠[228-230],可选择的替代方法包括E试验、微量肉汤稀释法和琼脂稀释法[227]。氟喹诺酮类与治疗的高失败率相关[231],故不应将其纳入药敏测试板条。多项研究表明,替加环素对类鼻疽伯克霍尔德菌具有很好的抗菌活性,且在类鼻疽伯克霍尔德菌感染的动物模型中,替加环素联合其他抗菌药物治疗也有效[232-233],但是目前尚无临床试验数据支持其应用。

目前类鼻疽的治疗方案为头孢他啶或美罗培南初始强化治疗至少10～14天,随后使用TMP-SMX进行至少3个月的根除治疗[78-79,234-235]。传统根除治疗方案是多西环素联合TMP-SMX,但最近泰国的一项临床试验支持根除治疗期单用TMP-SMX[236]。在澳大利亚,神经系统、前列腺、皮肤组织及骨和关节组织类鼻疽的强化治疗阶段使用TMP-SMX联合头孢他啶或美罗培南。尽管有专家仍然推荐TMP-SMX用于儿童和中晚期妊娠的孕妇的治疗,但阿莫西林/克拉维酸可以替代TMP-SMX用于妊娠期患者和儿童患者的根除治疗。阿莫西林/克拉维酸的使用剂量非常重要,相关指南对此有所描述[237]。对于重症监护患者,美罗培南或亚胺培南可能优于头孢他啶[232]。尽管泰国的一项研究显示应用粒细胞集落刺激因子并无益处[238-241],但一些治疗中心仍采用这种治疗方法[234,236]。已颁布的指南建议,根据临床表现、疾病严重程度及感染部位,可决定是否需延长静脉注射抗菌药物强化期的时间[242]。一项对复发性类鼻疽病例进行分子基因分型的早期研究显示,抗菌药物治疗后复发率是9.7%,新发感染占3.4%[90]。得益于目前的治疗药物,现在此病复发率明显降低,但新发感染病例仍持续出现[243]。

由于鼻疽伯克霍尔德菌是一种潜在的生物恐怖病原体,最近的研究致力于检测多种抗生素对该菌的抗菌活性。鼻疽伯克霍尔德菌的抗菌药物敏感谱与类鼻疽伯克霍尔德菌类似,但鼻疽伯克霍尔德菌对氨基糖苷类及新的大环内酯类,如克拉霉素和阿奇霉素等均敏感,而类鼻疽伯克霍尔德菌则均耐药[244]。目前,鼻疽的推荐治疗方案和疗程均与类鼻疽一致。

实验室人员意外暴露类鼻疽伯克霍尔德菌和鼻疽伯克霍尔德菌的管理指南已经发表[216,245]。

嗜麦芽窄食单胞菌对多种抗生素天然耐药。在感染期间,其耐药性可以快速发展[246]。至少有2种β-内酰胺酶可介导该菌对β-内酰胺类耐药,其中一种为锌离子依赖型,并可耐受β-内酰胺酶抑制剂且导致对亚胺培南耐药。氨基糖苷类和喹诺酮类耐药是由外膜蛋白突变所致。一项有关CF患者临床标本分离株的研究显示,多西环素的体外抗菌活性最强[247]。TMP-SMX通常具有抗菌活性,在治疗中常与替卡西林/克拉维酸、米诺环素或者哌拉西林/他唑巴坦等联合应用[247]。其他用药组合包括环丙沙星与替卡西林/克拉维酸、环丙沙星与哌拉西林/他唑巴坦,或多西环素与替卡西林/克拉维酸等也可能有效。有文献报道替加环素和新型联合方案,即氨曲南联合阿维巴坦,均表现出良好的体外抗菌活性[248]。CLSI对纸片扩散法药敏试验结果解释标准适用于米诺环素、左氧氟沙星和TMP-SMX[225]。美国许多实验室仅评估TMP-SMX的抗菌活性,必要时再加试其他抗生素如米诺环素、头孢他啶、替卡西林/克拉维酸及环丙沙星或左氧氟沙星等。

通常,睾酮丛毛单胞菌对超广谱和广谱头孢菌素类、碳青霉烯类、喹诺酮类及TMP-SMX均敏感[249],而食酸代尔夫特菌常对氨基糖苷类耐药。由于代尔夫特菌属、食酸菌属及短波单胞菌属是否能引起人类感染尚无定论,因而人类标本中分离到此类菌株,可能无须进行常规药敏试验。

十二、结果的评价、解释和报告

这些菌种存在于自然环境，在偶然情况下可能对临床标本造成污染，但它们也是医院获得性和机会致病菌，尤其对于特定的患者人群，如 CF 患者。对于此类细菌，商品化的细菌鉴定系统可能出现错误的鉴定结果，临床实验室分离到这些菌种时必须慎重考虑，特别是洋葱伯克霍尔德菌复合群内各菌种并不能通过表型分析可靠地进行区分，且 MALDI-TOF MS 不能准确地鉴定复合群内所有菌种。CF 患者中分离到此类细菌会对患者管理和社会心理健康产生严重的不良影响。这些菌种的鉴定应由参考实验室进行基因型分析予以确证，并立即报告给 CF 治疗团队。在任何情况下分离到类鼻疽伯克霍尔德菌和鼻疽伯克霍尔德菌，通常应考虑与临床疾病有关。这些菌种的鉴定需要通过有经验的参考实验室加以确认。必须严格保证培养物的处理和转移符合最新的生物安全法规(第 19 章)。由于这些菌种是潜在的生物恐怖病原体，因而其鉴定结果必须上报公共健康部门(第 15 章)。在 CF 患者以外的人群中分离到本章所描述的其他菌属，其临床意义尚不明确，解释时应谨慎。

这些菌种大多缺少纸片扩散法药物敏感性试验的解释标准，故 MIC 微量肉汤稀释法和 E 试验是药敏试验的首选方法。对于多重耐药菌，可以考虑提交参考实验室进行两联或三联药物敏感性试验，筛选出具有协同作用的抗菌药物[221]。然而，值得注意的是，无论是微量肉汤棋盘稀释法还是多种抗菌药物联合杀菌试验，目前均尚未标准化。

参考文献请扫二维码查阅

第46章　不动杆菌属、金黄杆菌属、莫拉菌属和其他非发酵的革兰阴性杆菌*

PIET COOLS, ALEXANDR NEMEC, PETER KÄMPFER, MARIO VANEECHOUTTE

（王倩　译；陈茶、王辉　审校）

一、分类

本章所讨论的细菌是一组在分类学和种系发育上不同的、非发酵的革兰阴性杆菌和球杆菌。其中一些菌属隶属于相同的菌科，如不动杆菌属（*Acinetobacter*）、莫拉菌属（*Moraxella*）、寡源菌属（*Oligella*）及冷杆菌属（*Psychrobacter*）隶属于γ变形菌纲的莫拉菌科[1]，而浴者菌属（*Balneatrix*）、伯杰菌属（*Bergeyella*）、金黄杆菌属（*Chryseobacterium*）、伊丽莎白金菌属（*Elizabethkingia*）、稳杆菌属（*Empedobacter*）、类香味菌属（*Myroides*）、鞘氨醇杆菌属（*Sphingobacterium*）、沃氏菌属（*Wautersiella*）和威克斯菌属（*Weeksella*）隶属于拟杆菌纲的黄杆菌科（Flavobacteriaceae）[2]。

二、生物学性状

本章涉及的所有细菌具有共同表型特征：触酶阳性，且在克氏双糖铁琼脂（KIA）、三糖铁（TSI）琼脂或氧化-发酵培养基上的底部不产酸，这提示其不能通过发酵途径代谢糖类。这些微生物在需氧条件下生长明显优于厌氧条件，许多仅能以氧作为呼吸途径的终末电子受体的菌种，根本无法在厌氧条件下生长。

三、流行病学和传播

本章绝大部分细菌存在于自然环境中，如土壤和水。对于甲基杆菌（*Methylobacteria*），自来水可能是其在医院环境中的传播媒介，之前已有文献描述了在供水系统中监测该菌的方法[3]。除不动杆菌属细菌和卡他莫拉菌（*Moraxella catarrhalis*）外，本章所讨论的菌种尚无人与人之间传播的文献报道。

四、临床意义

本章中涉及的几乎所有的菌种都有引起脑膜炎和心内膜炎的病例报道，这些菌的临床意义主要限于条件致病菌。但是，脑膜脓毒伊丽莎白金菌（*Elizabethkingia meningoseptica*）、眼部感染中分离的腔隙莫拉菌（*Moraxella lacunata*）、呼吸道感染中分离的卡他莫拉菌和乙酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合群（*Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex），通常被认为是有临床意义的病原菌。

资料显示，鲍曼不动杆菌（*Acinetobacter baumannii*）引起的呼吸机相关性肺炎和血流感染，具有很高的发病率和病死率[4]。鲍曼不动杆菌独特的临床表现在于其引起战争中重伤的士兵[5]和自

---

*本章包含 Mario Vaneechoutte、Alexandr Nemec、Peter Kampfer、Piet Cools 和 Georges Wauters 在本手册第11版第44章中呈现的部分内容

然灾害受难者[6]的感染。

鲍曼不动杆菌感染的临床意义一直以来存在着争议[7-8]，事实上，虽然鲍曼不动杆菌可以引起严重的感染，但其定植比感染更为常见，且感染与定植的区别难以界定。尽管不常见，但是鲍曼不动杆菌引起的社区获得性感染仍有发生。尤其是在热带地区，如东南亚和地处于热带的澳大利亚，该菌所致的社区获得性肺炎的报道日益增多[9-10]。

尽管皮特不动杆菌（*Acinetobacter pittii*）、医院不动杆菌（*Acinetobacter nosocomialis*）和鲍曼不动杆菌的亲缘关系接近，并且在临床扮演的角色也与鲍曼不动杆菌相类似，鲍曼不动杆菌与多重耐药和医院内流行性播散关系更为密切，且可能与全身感染患者较高的病死率有关[11]。

不动杆菌属其他菌种（表46-1）偶见于人类感染。约翰逊不动杆菌（*A. johnsonii*）、洛菲不动杆菌（*A. lwoffii*）及抗辐射不动杆菌（*A. radioresistens*）常定植于人体皮肤表面[12]。有些菌种，特别是乌尔新不动杆菌（*A. ursingii*），可引起住院患者的血流感染[13,15]；琼氏不动杆菌（*A. junii*）和土壤不动杆菌（*A. soli*）与新生儿感染暴发有关[16-17]；小不动杆菌（*A. parvus*）可分离于血培养[15,18]，但常因为菌落细小而被忽略。上述菌种引起的多数感染与血管内留置导管或其他医源性操作有关[13,19]，病程通常温和。其他各种不动杆菌属菌种，虽然可从临床标本中分离到，但其在感染中可能发挥的作用尚未明确。

卡他莫拉菌是引起人类黏膜病变的病原体。有文献报道[20]，其致病的分子机制涉及卡他莫拉菌的代谢和发病机制，包括细胞黏附，靶细胞侵入和宿主免疫反应调节。莫拉菌属细菌是引起某些感染（结膜炎、角膜炎、脑膜炎、脓毒症、心内膜炎、关节炎和耳鼻喉感染）的病原体[21-26]。还有文献报道，卡他莫拉菌可以引起鼻窦炎、上呼吸道感染和中耳炎，这是通过定植于呼吸道的菌株向邻近组织扩散而引起[21,27]。

然而，由于卡他莫拉菌是儿童上呼吸道常见的共生菌，故儿童上呼吸道标本（如咽拭子培养）分离出该菌不能作为中耳炎和鼻窦炎感染的病原学依据[27,28]，而对于鼻窦抽吸物和鼓膜穿刺术抽取的中耳液中分离出的菌株，应进行鉴定并报道。

尽管成人感染卡他莫拉菌导致下呼吸道感染，尤其是慢性阻塞性肺疾病的病原学证据清楚[28-29]，但是该菌的发病机制尚不明确。之所以认为卡他莫拉菌是致病菌，这是因为：①该菌不是成人上呼吸道常见的共生菌[28]；②该菌引起的重症支气管炎和肺炎患者，其痰标本革兰染色涂片镜检时会发现大量的白细胞，许多革兰阴性双球菌唯一存在或占优势，且出现细胞内吞噬的革兰阴性双球菌。这类标本培养时，纯培养出卡他莫拉菌，应进行鉴定和报道。卡他莫拉菌可引起免疫力低下的宿主发生各种重症感染，包括肺炎、心内膜炎、脓毒血症和脑膜炎[29]。

莫拉菌属其他菌种与卡他莫拉菌相似，定植于人体上呼吸道正常菌群中，极少引起侵袭性疾病。仅有少数病例报道显示可引起心内膜炎、菌血症、化脓性关节炎和眼内炎。据报道，非液化莫拉菌（*Moraxella nonliquefaciens*）引起1例致命性心内膜炎[30]。非液化莫拉菌[5,31]少见于脑脊液标本，仅有1个病例报道该菌引起新生儿脑膜炎。随着细菌分类的相对丰富、细化，引起急性鼻窦炎的病原菌涉及普氏栖粪杆菌（*Faecalibacterium prausnitzii*）、阿克曼菌属（*Akkermansia* spp.）和富集的非液化莫拉菌。一项儿童鼻咽菌群与鼻窦炎关系的研究显示，非液化莫拉菌富集也是儿童鼻咽基线样本菌群分布的一个特征，这些儿童随后在为期1年多的研究中患上急性鼻窦炎[32]。这些发现在上呼吸道菌群分析研究中得到证实[33]。目前，基于常规实验室技术进行细菌种水平的鉴定具有挑战性，菌种的最终鉴定通常是通过16S rRNA测序和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）技术[34]。奥斯陆莫拉菌（*Moraxella osloensis*）[35-36]分离于呼吸系统以外的临床样本（尤其是危重病人的血培养），腔隙莫拉菌与感染性心内膜炎有关[26]。犬莫拉菌（*Moraxella canis*）分离于狗咬伤后的伤口[37]和体弱患者[23]。猪莫拉菌（*Moraxella porci*）和多动物莫拉菌（*Moraxella plurianimalium*）分离于病理进程不同的猪和绵羊[38-39]。腔隙莫拉菌可引起眼部感染和感染性心内膜炎[40-41]。

五、标本的采集、转运和保存

第12章和第19章详述的标本的采集、转运和保存的标准方法完全适用于本章细菌。本章唯

表 46-1 氧化酶阴性、吲哚阴性的非发酵革兰阴性杆菌：不动杆菌属细菌生物学特性[a]

生物学特性	鲍曼不动杆菌(25)[b,c]	乙酸钙不动杆菌(11)[c]	戴克肖不动杆菌(5)[c]	医院不动杆菌(20)[c]	皮特不动杆菌(20)[c]	塞弗特不动杆菌(16)[c]	贝杰林克不动杆菌(15)	贝雷占不动杆菌(16)	库尔瓦兰不动杆菌(9)	耐黏菌素不动杆菌(24)	散布不动杆菌(9)	吉洛不动杆菌(17)	吉伦伯格不动杆菌(9)	溶血不动杆菌(16)	约翰逊不动杆菌(30)	琼氏不动杆菌(14)	洛菲不动杆菌(16)	温和不动杆菌(7)	小不动杆菌(10)	解蛋白不动杆菌(6)	抗辐射不动杆菌(12)	逊德勒不动杆菌(22)	土壤不动杆菌(5)	乌尔新不动杆菌(29)	可变不动杆菌(16)	维维安不动杆菌(9)
生长温度																										
44℃	100[d]	0	60	95	10	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31[d]	0
41℃	100	9	100	100	100	94	0	0	50[d]	0	0	0	0	94	0	93	6	0	0	0	100	100	80	0	100	0
37℃	100	91	100	100	100	100	100	100[e]	100	82	100	0[e]	100	100	10[d]	100	100	100	90	100	100	100	100	100	100	100
D-葡萄糖产酸	100	91	100	100	95	100	0	88	100	100	0	0	0	75	0	0	19	0	0	0	0	0	100	0	13	89
同化作用：																										
反-Aconitate	92	100	100	60	100	100	0	38	44	0	11	12	0	63	0	0	6	0	0	100	0	0	100	0	6	56
己二酸盐	88	100	100	95	100	63	0	63	100	0	22	100	100	0	0	0	81	14	0	67	100	41	100	100	69	89
β-丙氨酸	100	91	100	85	90	88	0	100	89	17	100	94	100	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	100
4-氨基丁酸盐	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	88	/[f]	100	83	86	88	0	0	/[f]	100	0	100	0	19	100
L-精氨酸	100	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	0	100	94	83	93	0	100	0	100	83	0	100	0	19	100
L-天冬氨酸	100	100	100	100	100	100	100	100	11	0	0	100	0	31	83	21	0	0	0	0	0	0	100	97[d]	0	11
壬二酸盐	88	100	100	95	100	63	0	63	100	0	22	100	100	0	0	0	100	0	0	67	100	64	100	100	81	89
枸橼酸盐	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	75	90	79	13	0	0	100	0	59[d]	100	100	25	100
乙醇	96	91	100	100	100	100	100	100	0	17	11	100	22	94	100	93	100	100	100	0	100	95	100	100	100	0
D-葡萄糖	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0
谷氨酸盐	96	91	100	95	90	100	0	100	100	0	100	100	/[f]	0	0	0	0	0	0	33	100	95	100	97	19	89
L-组氨酸	96	100	100	100	100	94	100	94	100	100	100	94	100	100	0	93	0	100	0	100	0	0	100	0	0	100
DL-乳酸盐	100	100	100	100	100	100	0	100	100	96	100	100	100	0	100	93	89	0	0	100	100	100	100	100	6	100
丙二酸盐	88	100	100	20	95	75	100	0	100	8	22	18	78	0	73	0	6	0	0	67	100	0	100	0	0	100
苯乙酸盐	84	100	100	85	75	88	0	25	100	96	89	65	100	0	0	0	69	0	0	83	100	0	100	0	75	100
腐胺	96	100	100	95	100	81	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	92	0	0	0	0	78
明胶酶	0	0	0	0	0	0	13	0	100	100	100	0	100	94	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0
绵羊血溶血	0	0	0	0	0	0	100	0	89	100	100	0	100	100	60[d]	50	0	100	0	100	0	0	60	0	0	100

注：[a] 资料来自同一实验室(A. Nemec)之前的研究数据[79,80]。[b] 菌名后面括号内数字是测试的菌株数，数值是指定试验中阳性菌株的百分率，碳同化试验在 30℃孵育 6 天后判读结果。[c] 乙酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合群菌种[72-74]。[d] 大多数阳性反应菌株生长不良。[e] 生长试验在 38℃孵育，而不是 37℃。[f] 大多数菌株不能重现生长或生长迟缓

有几种苛养菌需要特殊处理，包括浅井菌属（*Asaia*）、贝赛斯达颗粒杆菌（*Granulibacter bethesdensis*）、甲基杆菌属（*Methylobacterium*）及一些莫拉菌属的细菌；这些菌株应接种在含有血液的培养基上。

六、直接检查

本章细菌进行样本直接显微镜检查时，各菌种无明显的形态学特征可供识别，细菌革兰染色镜下形态为革兰阴性杆菌、球杆菌或双球菌。直接抗原试验和分子遗传学试验均不能直接用于临床样品的检测。

七、分离培养操作

细菌初代培养温度应设定为35～37℃，但不排除有些菌株（包括许多产粉红色色素的菌种）在30℃以下条件生长得更好，故可能需要把平板置于室温中进行培养。并且，在这种情况下，各种试验也需要在室温条件下进行。实际上，一些商品化的试剂盒，如API 20NE，孵育温度即设定为30℃。

细菌在某些选择性基础培养基（如麦康凯琼脂）上生长是可变的，这可能是受到培养基成分各种变化的影响。革兰阴性非发酵菌（GNF）在麦康凯琼脂上生长通常形成无色菌落，有些细菌因吸收琼脂培养基中的结晶紫而形成淡紫色或紫色菌落。不动杆菌属[42]和莫拉菌属[43]细菌的选择性培养基参见文献描述。

八、鉴定

本章提供的导引框架图（图46-1），可鉴别五大群细菌的各菌种。图中分类仅依据菌落颜色（有或无粉红色）、氧化酶（阴性或阳性）、是否产生吲哚，以及苯甲基精氨酸氨肽酶（蛋白水解酶）活性。

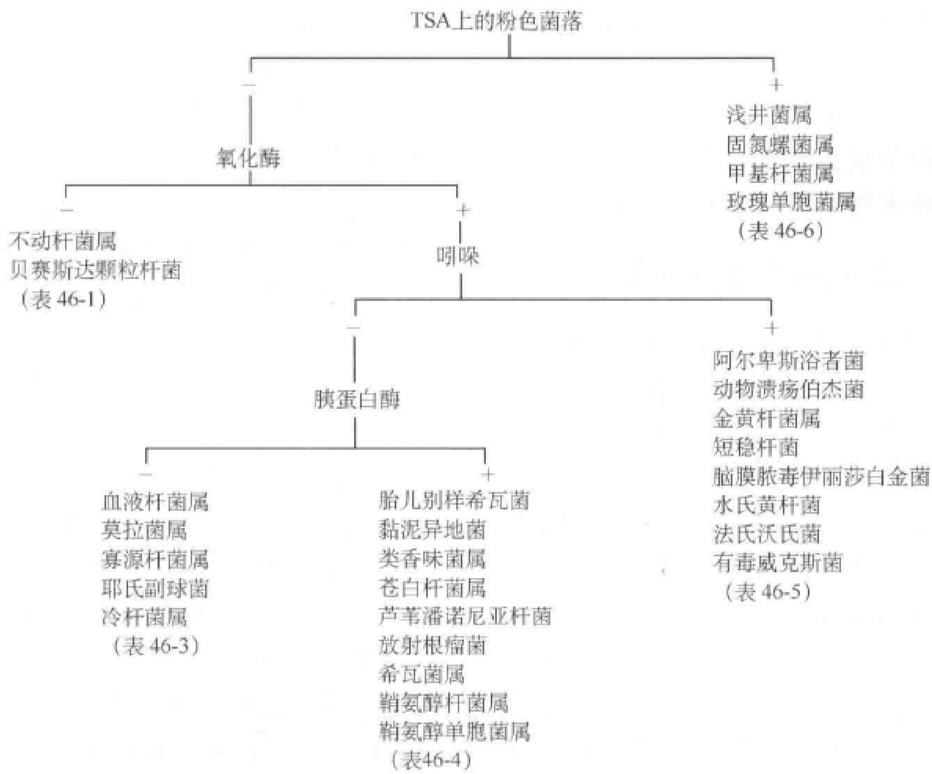


图46-1 各种革兰阴性非发酵菌的鉴定。本章细菌属于一群分类多样的革兰阴性非发酵杆菌和球杆菌，具有共同的表型特征：在克氏双糖铁琼脂（KIA）、三糖铁（TSI）琼脂或氧化-发酵培养基的底部不产酸，不能通过发酵途径代谢糖类。修订后的假单胞菌属（第44章）细菌和之前命名为假单胞菌属的菌种（第45章）都具有上述特征。贝赛斯达颗粒杆菌在血琼脂培养基上生长缓慢且不良，小不动杆菌也是形成小菌落，培养24 h后肉眼可见菌落

图 46-1 中标注的表 46-1、表 46-3 至表 46-6，提供了进一步鉴定五个群中各菌种的生化反应试验，其中各种酶反应需在孵育数小时或 2 天内判读结果，而碳源同化试验（不动杆菌属）和糖类分解产酸试验应分别在 6 天和 7 天判读结果。

对于每群中亲缘关系接近的菌种，本章列举了其分类史（注明过去曾使用的其他名称，介绍自上一版后分类学的变化），阐述了菌种的临床重要性，并描述不同菌群及同一菌群内不同菌种进行表型鉴别的资料。必要时，相关的药敏特征和治疗选择用药随即讨论；否则，该内容在本章五大群细菌每一部分的最后处进行讨论。

虽然某些菌属包含的菌种比本章这里阐述的更多些，但是本章重点关注那些临床样本中能够分离到的菌种。

(一)经典的生化鉴定方案

除不动杆菌属细菌外，本章列举的所有菌种的生化试验由 Georges Wauters 按照标准化操作程序执行完成，详细资料见第 35 章。在本章中，为数不多的试验用于菌种间的鉴别，选择这些鉴别试验的原因包括：①操作简便和快速；②对于每一群或每一种细菌大多能产生一致的结果；③鉴别能力强。不动杆菌属标准的理化和代谢试验资料由本章的一位作者提供（见表 46-1 脚注）。

(二)自动化、商品化的表型鉴定系统

很多实验室原先使用的传统诊断系统（如氧化-发酵培养基、需氧低蛋白胨培养基或者缓冲的单一基质底物）现已被商品化试剂盒或 VITEK 2（bioMérieux，Marcy l'Etoile，法国）、Phoenix（BD Diagnostic Systems，Sparks，MD）等自动化检测系统所取代。商品化试剂盒鉴定本章 GNF 菌群具有不确定性，经常仅能鉴定到属或群水平，需要补充生化试验才能鉴定到种。O'Hara 和 Miller[44] 应用 VITEK 2 革兰阴性杆菌鉴定卡（ID-GNB）检测并报道了 103 例葡萄糖发酵和非发酵的非肠道菌株，其中正确鉴定为 88 例（85.4%），置信度为“极好的”或“好的”，10 例（9.7%）为低水平分辨力的正确鉴定，总的正确率为 95.1%。Bosshard 等[45] 应用 16S rRNA 基因测序方法鉴定临床相关的 GNF 菌株（非铜绿假单胞菌），并与 2 种商品化的鉴定系统（API 20NE 和 VITEK 2 荧光卡，bioMérieux）相比较，通过 16S rRNA 基因序列分析，92%的菌株鉴定到种水平，8%的菌株鉴定到属水平；应用 API 20NE，54%的菌株鉴定到种水平，7%的菌株鉴定到属水平，39%的菌株不能在任何分类水平上鉴别出来；而相应的，VITEK 2 鉴定率分别为 53%、1%和 46%。分别有 15%和 43%的相应种水平的菌株未包含在 API 20NE 和 VITEK 2 数据库里。总之，商品化的鉴定系统能够用于鉴定临床标本中的常见细菌，如肠杆菌科细菌，而对于罕见细菌其鉴定能力则差强人意。

(三)化学分类方法

革兰阴性非发酵菌（GNF）常见菌种的脂肪酸谱数据资料已出版发行[46]。

(四)基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析法

在临床细菌学领域，很少有技术如基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）那样，对微生物的鉴定产生如此快速而深远的影响[47-48]。传统的细菌鉴定方法依靠生化特性，需要较长时间的孵育，而 MALDI-TOF MS 可以数分钟内直接对平板上生长的菌落进行细菌鉴定。MALDI-TOF MS 有不同的商品化平台可供使用，如 MALDI Bio Typer（Bruker Daltonics）、SARAMIS（Shimadzu & Anagnostec）和 VITEK MS（bioMérieux），虽然质谱分析设备最初的价格和维护成本相对高一些，但是每株菌额外的鉴定成本是极低的。

在菌种鉴定上，MALDI-TOF MS 的可靠性和准确率研究总结参见表 46-2。现在，MALDI-TOF MS 技术用于菌种鉴定，获得正确鉴定最大的困难在于数据库缺乏新出现菌种的蛋白质谱。而这些问题能够通过不断创建新的数据库或增加缺少的菌株蛋白质谱加以解决[49-50]。

BioTyper 和 VITEK MS 系统鉴定 GNF 的准确率相近[51]，且 2 个鉴定系统操作均优于传统方法[51]。Mellmann 及其同事[52] 在一项应用 MALDI-TOF MS 鉴定 480 株 GNF 的研究中，8 个实验室室间结果的重复性达 98.75%。

表 46-2 MALDI-TOF MS 与其他鉴定方法的准确度比较[a]

菌种(菌株数)	MALDI-TOF MS 结果	参考文献
鲍曼不动杆菌(141)[b,c,d,e,f]	鲍曼不动杆菌(135)[g,h],不动杆菌属(6)[g,i]	48,288～291
贝杰林克不动杆菌(3)[e,j]	贝杰林克不动杆菌(2), *A. tjernbergiae*(1)	292
贝雷占不动杆菌(18)[e,j]	贝雷占不动杆菌(11)[k],皮特不动杆菌(7)	292,289
醋酸钙不动杆菌(11)[b,d,e]	醋酸钙不动杆菌,不动杆菌属(8)[g],皮特不动杆菌(2)	48,289,290
皮特不动杆菌(8)[e,j]	皮特不动杆菌(8)	289
医院不动杆菌(3)[e,j]	不动杆菌属,鲍曼不动杆菌(2)	289
库尔瓦兰不动杆菌(2)[d,e,j]	皮特不动杆菌(2)[l]	48,289
散布不动杆菌[d,j]	不动杆菌属	48
吉洛不动杆菌(11)[e]	吉洛不动杆菌(11)	292
溶血不动杆菌(3)[d]	溶血不动杆菌(3)	48,292
约翰逊不动杆菌(5)[b,f]	约翰逊不动杆菌(2)[g,h],琼氏不动杆菌[g],不动杆菌属[g,h]	288,290,291
琼氏不动杆菌(7)[d,e,f]	琼氏不动杆菌(7)[g,h]	48,288,289
洛菲不动杆菌(8)[c,d,f]	洛菲不动杆菌(6)[g,h,i],不动杆菌属[g],人苍白杆菌[g]	48,288
医院不动杆菌(18)[d]	医院不动杆菌(18)[m]	48
皮特不动杆菌(16)[d]	皮特不动杆菌(16)	48
抗辐射不动杆菌(4)[b,d,f,j]	抗辐射不动杆菌(3)[g,h],错误鉴定[n]	48,288,290
逊德勒不动杆菌[f]	逊德勒不动杆菌[g,h]	288
土壤不动杆菌[e,j]	拜尔利不动杆菌	289
乌尔新不动杆菌(2)[f]	乌尔新不动杆菌,[g,h] 不动杆菌属[g,h]	288
不动杆菌属[b]	琼氏不动杆菌/溶血不动杆菌[g]	290
黏金黄杆菌[b]	无鉴定结果[g,o]	291
产吲哚金黄杆菌(6)[b,f]	产吲哚金黄杆菌(5)[g],无鉴定结果(1)[k,o]	50,51,291
金黄杆菌属(1)[b]	产吲哚金黄杆菌(1)[g]	291
脑膜脓毒伊丽莎白金菌(3)[b,f]	脑膜脓毒伊丽莎白金菌(2)[g,h],和平空间站伊丽莎白金菌(1)[k]	50,51,288
卡他莫拉菌(18)[b]	卡他莫拉菌(18)[g]	290
人苍白杆菌(29)[b,f]	人苍白杆菌(6)[g,k],苍白杆菌属(21)[g,k],*O. tritici*(2)[g,k]	291;G. Wauters(未发表)
中间苍白杆菌(9)[b,f]	中间苍白杆菌(9)[g,k]	Wauters(未发表)
苍白杆菌属[b]	人苍白杆菌[g]	291
寡源菌属[b]	尿道寡源菌[g]	291
苯丙酮酸冷杆菌[f,j]	无鉴定结果[g,o]	288
放射根瘤菌(3)[b,f]	放射根瘤菌(3)[g,h]	288,291
黏液玫瑰单胞菌[f,j]	错误鉴定[g,h]	288
海藻希瓦菌[f,j]	无鉴定结果[g,h]	288
食醇鞘氨醇杆菌[b]	食醇鞘氨醇杆菌[g]	291
无鉴定结果(5)[b,f]	不动杆菌属(2),[k] 解儿丁质污蝇单胞菌(3)[g]	50;Wauters(未发表)

注:[a] 除参考文献[51]比较了 Bruker 和 VITEK 系统外,所有鉴定结果来自 Bruker MALDI-TOF MS 系统。菌名后括号中的数字表示测试的菌株数。[b] 传统方法鉴定结果有差异的菌株,均通过 16S rRNA 基因测序的方法进行确认。[c] 传统生化鉴定方法。[d] 通过 ARDRA 法、rRNA 基因间隔区(ITS)、*recA* 测序和(或)bla_{OXA-51} PCR 进行鉴定。[e] 通过 bla_{OXA-51} PCR 和(或)*rpoB* 基因测序鉴定。[f] 通过 16S rRNA 基因测序鉴定。[g] 直接转换法。[h] 鉴定也考虑到拇指规则(经验法则),如果第一个选项菌种 Log 值<1.7,那么前 2 个菌种间的差异应>0.2。[i] 乙醇/甲酸提取。[j] 当前数据库里没有或处在研究阶段的数据库。[k] 使用自建的 MALDI-TOF MS 数据库。[l] ARDRA 和 *recA* 测序鉴定是不动杆菌属 14BJ 生物种,但是 ITS 测序和 MALDI-TOF MS 鉴定是皮特不动杆菌。[m] 医院不动杆菌纳入数据库之后。[n] 菌属鉴定错误。[o] Log 值<1.7

Schaller 及其同事[53] 报道，MALDI-TOF MS作为快捷而有力的分型工具，可对前述的卡他莫拉菌的 2 种亚群和 3 种 16S rRNA 类型进行分型。Mencacci 及其同事[54]探讨应用 MALDI-TOF MS 检测多重耐药的鲍曼不动杆菌暴发时，该菌在医院内的传播，并与基于重复序列 PCR 的 DiversiLab 系统（bioMérieux）检测结果相比较，提示该技术在常规临床微生物学实验室具有很好的前景。

(五)基于 DNA 序列的方法

总体而言，基于靶基因包括 rRNA（16S，16S-23S 间隔区或 23S）和管家基因的序列分析方法已成为细菌鉴定的标准化技术[55]，此技术有利于更好地划分一些菌群、发现和描述新菌种，靶基因包括编码 RNA 聚合酶 B 亚基基因（*rpoB*）、促旋酶 B 亚基基因（*gyrB*）或重组 A 蛋白基因（*recA*）。由于这些方法普遍适用，故不再详述其对本章菌种的鉴定。但有些菌种多位点序列分型（MLST）方案可以通过链接网址（https://pubmlst.org/data/）获取，也可以通过 EzCloud 主页[38]（http://www.ezbiocloud.net/taxonomy）获取个别菌种的基因组数据。值得一提的是，EzCloud 主页上列出的菌种基因组数据关于给定分类的可靠性由 EzCloud 数据库供应商核查。

其他基于核酸序列的方法中，DNA 阵列杂交技术已应用于本章菌群中一些菌种的鉴定[56]；DNA 序列指纹图谱方法，如扩增核糖体 DNA（rRNA 基因）限制性分析[57-58]和 tDNA PCR[59-60]也应用于个别菌群中一些菌种的鉴定。虽然这些指纹图谱方法也普遍适用，但是这些方法需要建立参考指纹图谱数据库，并且不同的电泳平台和实验室间数据通常难以相互比较。

下一代测序（NGS）可在一次运行中对众多细菌的全基因组进行测序，初始材料 DNA 可来自临床样本的分离菌株或微生物群（基因组学）。由于是对菌株进行全基因组测序，故单次检测可提供多种应用，如鉴定、分型（全基因组 MLST），以及检测耐药和毒力标志物。

下一代测序方法对鲍曼不动杆菌的菌株分型优于 MLST 和 PFGE，并对深入了解多重耐药鲍曼不动杆菌暴发的传播动力学提供可能[61]。

九、五种基因型菌群的鉴定

(一)氧化酶阴性的 GNF

1. 不动杆菌属 不动杆菌属的细菌严格需氧，氧化酶阴性，触酶阳性，呈球杆状。不动杆菌属细菌革兰染色阴性，不易脱色。由于缺乏异化硝酸盐还原酶，大部分菌株不能还原硝酸盐为亚硝酸盐。该菌通常吐温 80 酯酶阳性，而溶血性和明胶酶不定。单个菌体直径 0.9～1.6 μm，长度 1.5～2.5 μm，在静止生长期，菌体通常呈球形，成对存在。大部分菌株能够在 20～35℃生长，临床相关菌种通常在 37℃生长良好，但也有些菌种吉洛不动杆菌（*Acinetobacter guillouiae*）和约翰逊不动杆菌体外 37℃生长不良或不生长。

不动杆菌的名称（来源于希腊文 *akineto*，“不动的”）顾名思义，这些细菌没有鞭毛，缺乏游泳式动力（swimming motility），但在软琼脂上可产生表面移位——“颤搐的动力”[62]，有些菌株能够在物体表面上快速地传播。以鲍曼不动杆菌 ATCC 17 978 为例，24℃培养时，低强度白光（特别是其蓝色组分）能够刺激调节一些代谢过程，抑制细菌动力和生物膜及薄膜的形成；而 37℃培养时，鲍曼不动杆菌的光调节现象消失[62]。进一步研究显示，光调节现象广泛存在于不动杆菌属其他菌种[63]，蓝光可决定这些菌种动力和生物膜的形成，也有助于细菌适应不同的环境。

该属细菌能够在液体培养基表面形成一层薄膜，在血琼脂、营养琼脂，尤其是麦康凯琼脂等复合培养基上生长良好。细菌孵育 24 h 后，菌落直径 1～2 mm（除外小不动杆菌，非常明显的小菌落），无色或浅褐色，圆形凸起，光滑或黏液状（图 46-2），麦康凯琼脂上的菌落可变成粉红色。许多菌株能够利用各种有机化合物作为单一的碳源和能量来源。选择性增菌培养可将细菌接种于醋酸盐为碳源和铵盐为氮源的矿物质培养基中，30℃振荡孵育[42]。不动杆菌属总的特征已在前面的内容中进行了描述[64-65]。

不动杆菌属细菌广泛分布于自然界，包括土壤、水、污物和食品中，也存在于人类和动物的标本中，有些不动杆菌属菌种主要分离于人类[如鲍曼不动杆菌、耐黏菌素不动杆菌（*Acinetobacter colistiniresistens*）、医院不动杆菌和乌尔新不动杆菌]，

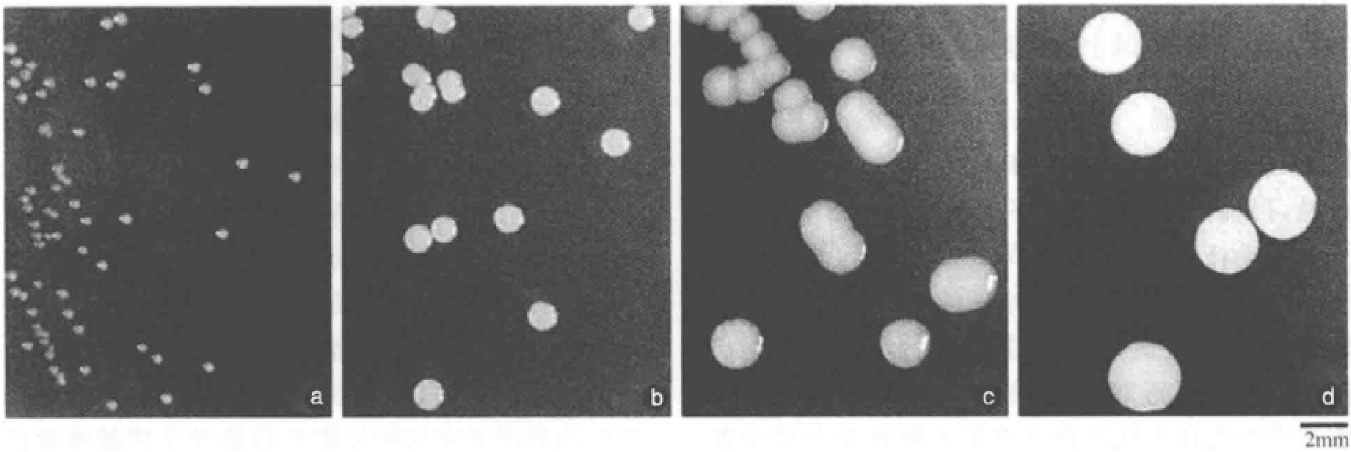


图 46-2 人类临床样本分离的鲍曼不动杆菌属菌落的大小差别，菌株生长在 TSA (Oxoid)培养基，30℃，24 h
注：a. 小不动杆菌 NIPH 384^{T}；b. 乌尔新不动杆菌 NIPH 137^{T}；c. 逊德勒不动杆菌(*Acinetobacter schindleri*) NIPH 1034^{T}；d. 鲍曼不动杆菌 ATCC 19606^{T}

而其他的菌种则栖息于不同的生态系统[如散布不动杆菌(*Acinetobacter dispersus*)、吉洛不动杆菌和约翰逊不动杆菌]或限定在特定的微生态环境中，如花卉经昆虫授粉生成花蜜的微生态环境[66]。

人们对大多数临床相关的不动杆菌属菌种的生态学仍了解甚少。鲍曼不动杆菌、皮特不动杆菌、医院不动杆菌和乌尔新不动杆菌主要分离于医院的临床标本。在医院外，人体皮肤表面鲍曼不动杆菌的携带率低[12]，而在热带地区鲍曼不动杆菌的携带率较高[67]。文献报道，包括多重耐药菌在内的鲍曼不动杆菌可分离于患病的动物[68]和住院治疗的马匹[69]，但尚未发现人体以外的储备库。由于鲍曼不动杆菌是医院内重要的病原体，对其菌株进行流行病学研究十分必要。鲍曼不动杆菌流行株能够很好地存活于环境中，因为它们通常分离自定植患者附近的设备、环境表面及物品上[70]。患者皮肤和黏膜多个部位可定植鲍曼不动杆菌，并持续数日至数周[71]。

(1)菌种的多样性和鉴定：最近，鲍曼不动杆菌属细菌的分类出现个别菌种(包括一些临床相关菌种)名称的更新，塞弗特不动杆菌(*Acinetobacter seifertii*)[72]和戴克肖不动杆菌(*Acinetobacter dijkshoorniae*)[73]是不动杆菌属(表 46-1)中具有重要临床意义的乙酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合群[74]的2个新菌种，塞弗特不动杆菌与鲍曼不动杆菌和医院不动杆菌相关，戴克肖不动杆菌与皮特不动杆菌遗传学亲缘关系密切。更新的其他菌种有可变不动杆菌(*Acinetobacter variabilis*)(以前称15TU基因种)[75]和一些具有溶血性的菌种如库尔瓦兰不动杆菌(*Acinetobacter courvalinii*)(以前称14BJ基因种)、散布不动杆菌(以前称17基因种)、温和不动杆菌(*Acinetobacter modestus*)、解蛋白不动杆菌(*Acinetobacter proteolyticus*)和维维安不动杆菌(*Acinetobacter vivianii*)。最后更新的临床相关菌种是耐黏菌素不动杆菌(以前称13BJ/14TU基因种)，该菌对多黏菌素类抗生素高水平天然耐药[76]。

截至2017年5月，不动杆菌属包括51个已命名的不同菌种(http://www.bacterio.net/acinetobacter.html)和个别临时分类的菌种(http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf)。近年研究显示，分离自定植或感染患者的不动杆菌几乎全部包含于这些菌种中[14-15,77]。这表明不动杆菌属目前的菌种分类很好地囊括了人体环境中发现的多种多样的不动杆菌。表46-1列出了人类临床样本中发现的有效命名的不动杆菌属菌种名称。

以细菌生理生化特性为依据的商品化鉴定系统对不动杆菌属菌种的鉴定存在问题，原因是系统容纳的菌种相关特性量少和(或)鉴定编码引用的数据质量不足。这些鉴定系统普遍不能将鲍曼不动杆菌和乙酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合群中的其他菌种鉴别开，对于葡萄糖不氧化的菌种如乌尔新不动杆菌和逊德勒不动杆菌会出现错误鉴定[13]。有研究比较了 VITEK 2 和 Phoenix 2

个系统对不动杆菌属 16 个临床菌种 76 株菌的鉴定能力，结果显示，VITEK 2 仅 19 株菌鉴定正确，而 Phoenix（M. Vaneechoutte，未发表的数据）仅 5 株菌鉴定正确。总的来说，常规诊断系统如 VITEK 2、Phoenix 和 API 20NE 在属水平上的鉴定是可靠的，但是在种水平上的鉴定不尽如人意。

不动杆菌属细菌更为可靠的表型鉴定方法是基于 Bouvet 和 Grimont 的改良系统[78]进行理化和营养试验（主要是碳源同化作用）。表 46-1 列出了该系统的更新，旨在区分临床相关的菌种，表中数据源自近年出版的已命名的不动杆菌几乎全部菌种表型的全面概述[79-80]。同化试验操作是使用基础的液体培养基补充 0.1%（重量/体积）的碳源[78]，30℃培养 6 天后，肉眼比较含碳源的接种试管和仅接种基础培养基的对照试管，评价细菌生长情况。然而，该方法不能明确地区分乙酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合群的菌种，且大多数试验需要自配试剂，故不利于该鉴定方案在常规诊断中的应用。

MALDI-TOF MS 是当前常规鉴定不动杆菌属各菌种最为快速、可靠的方法学平台[81]。尽管基于 MALDI-TOF MS 的鉴定系统可能受到数据库菌种不全的影响，但能够通过增加缺少的菌种蛋白质谱轻易地加以解决。质谱鉴定准确度高，尤其对分类学和系统发育学上很好区分开的菌种间的菌株，如约翰逊不动杆菌、抗辐射不动杆菌（*Acinetobacter radioresistens*）和乌尔新不动杆菌[82]。质谱对密切相关的菌种，如乙酸钙不动杆菌-鲍曼不动杆菌复合群中的菌种鉴别可能模棱两可，但能够通过改进 MALDI-TOF MS 分析加以解决[83-84]。

很多基因型方法能够准确地鉴定不动杆菌属细菌[64]，这些基于特定基因测序的基因型方法是当前的鉴定标准。常用的基因测序靶位有 *rpoB* 基因[78]和 16S rRNA 基因[85]，其中 *rpoB* 基因是不动杆菌属当前研究得最透彻的单基因分类标识，而 16S rRNA 基因鉴别系统发育学相近的菌种不理想[72]。PCR 检测鲍曼不动杆菌的固有基因 bla_{OXA-51} 样基因[86]，能够快速鉴定该菌。全基因组比较分析是最准确的细菌鉴定方法。已命名的不动杆菌属细菌的多种菌株基因组序列开放[79]和网站提供基于基因组的分类学参数计算，如平均核苷酸同源性（http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws）或 DNA 同源性分析（http://ggdc.dsmz.de），有助于开展精准的细菌鉴定。与全基因组相比较，仅用约 20%的基因组数据就能够获得稳定的平均核苷酸同源性数值，这对于获取基因组草图具有实用价值和经济价值[87]。

（2）基因分型和流行病学：很多分子方法用于同一菌种内不同菌株间的鉴别和不动杆菌属细菌（特别是鲍曼不动杆菌）的流行病学研究。这些方法中，脉冲场凝胶电泳大片段限制性分析[88]是分型的标准方法，但是该方法分辨率可能会受到并存的基因型密切相关但流行病学不同的菌株的限制。可变数目串联重复分型适用于鉴别基因型相关但流行病学不同的菌株[89]。依据特定的 OXA-51 样酶与鲍曼不动杆菌流行克隆间的相关性，提议 OXA-51 样基因序列分析应作为一种有用的分型方法[90]。随着全基因组测序技术的日益普及，许多研究将其用于医院暴发分析，全基因组分析在菌种鉴定、种群结构分析和医院内暴发调查等方面均优于传统的分型技术[91]。

多位点序列分型（MLST）是研究全球的、长期流行的菌株种群的标准方法，目前可用于鲍曼不动杆菌的 MLST 方案有 2 种：一种方案由 Bartual 等[92]提出，另一种方案由 Diancourt 等[93]提出（https://pubmlst.org/abaumannii）。2 种方案都是基于 7 个管家基因的固有片段，其中有 3 个基因是 2 种方案共享的。据报道[94]，2 种方案中 Bartual 等提出的方案具有更高的分辨率，但实际上 2 种方案产生的结果是可以兼容的。

鲍曼不动杆菌的一些国际谱系与多重耐药和医院内暴发有关，特别是称为“欧洲（或国际的）克隆Ⅰ和克隆Ⅱ”的流行株[7,93,95]。最早的克隆Ⅰ菌株分离于 1977 年[96]，流行于 20 世纪 80 年代和 90 年代一些欧洲国家暴发和多重耐药的不动杆菌属菌株中[97]。目前，虽然克隆Ⅰ和其他的谱系在某些地区[94,98-102]还很常见甚至流行，但是当前的多重耐药鲍曼不动杆菌全球种群中，克隆Ⅱ或其相关的菌株占有优势。分离株与国际谱系间的种群关系定位或新克隆的鉴定可通过前述的两种 MLST 方案完成，根据 Karah 等[94]研究，欧洲克隆Ⅰ和克隆Ⅱ分别对应于 Diancourt 等[93]方案里的克隆复合体 CC1 和 CC2，以及 Bartual 等[92]方案的克隆复合体 CC109 和 CC92。

（3）抗菌药物敏感性：鲍曼不动杆菌具有超凡

的能力，可发展为对所有用于治疗不动杆菌属的抗生素耐药[7-8]。随着鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类药物耐药比例的增加，将造成最终无药可选的局面，尽管这些菌株大部分对黏菌素仍保持敏感。即使多重耐药主要见于鲍曼不动杆菌，但其他临床相关的菌种如皮特不动杆菌、医院不动杆菌和乌尔新不动杆菌，也能对多种抗生素包括碳青霉烯类药物产生耐药[103-104]。鲍曼不动杆菌耐药机制包括当前所有已知的机制，如酶降解作用、靶位改变、主动外排和抗生素进入减少等，这些已知的耐药机制参见之前的文献综述[105]。近年的基因组研究在多重耐药的鲍曼不动杆菌耐药决定簇遗传结构方面取得进展。有研究发现，引起多重耐药的大片段水平基因转移和散在的可移动遗传元件（耐药岛）可整合到多数菌株特定的基因组位点上[97]。尽管耐药岛存在高度的克隆内变异，但在 2 种主要的鲍曼不动杆菌克隆中（译注：欧洲克隆Ⅰ和克隆Ⅱ），这些结构看起来是独立进化的[106-107]。

体外药敏检测可应用纸片扩散法、琼脂稀释法、肉汤稀释法或 Etest 方法完成。试验用抗菌药物应包括一系列治疗鲍曼不动杆菌可能有效的药物：第 3 代或 4 代头孢菌素、舒巴坦、抗假单胞菌的青霉素类/β-内酰胺酶抑制剂、碳青霉烯类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类、多黏菌素类和四环素类[108]。值得注意的是，由于黏菌素在琼脂内扩散能力差，其药敏试验不能采用纸片扩散法。比较 Etest 和肉汤微量稀释法测定的黏菌素 MIC 值，结果显示，MIC 值在 0.25～1.00 mg/L 范围内，2 种方法的结果一致性好[109]。

2. 贝赛斯达颗粒杆菌 贝赛斯达颗粒杆菌（α 变形菌纲、醋酸杆菌科）[110]是需氧的革兰阴性苛养菌，呈球杆状或杆状，是醋酸杆菌科内醋酸杆菌中新的亚属（颗粒杆菌属）的唯一菌种。该菌在羊血琼脂（SBA）上生长不良，最适生长温度为 35～37℃，最适宜的 pH 为 5.0～6.5，产生黄色素，氧化乳酸盐和少量醋酸盐生成二氧化碳和水，利用乙醇产酸，可利用甲醇作为单一碳源，上述特性可与其他醋酸菌相鉴别。贝赛斯达颗粒杆菌 DNA 碱基组成中 G+C 含量为 59.1 mol%。该菌首次分离于 3 例慢性肉芽肿病患者[110]，近期又从另外几例慢性肉芽肿病患者体内分离出[111-113]，其中 1 例出现重症脓毒症[112]。血清学反应性[110]和致病分子机制[110,114]是该菌近年来研究的热点。

(二)氧化酶阳性、吲哚阴性和胰蛋白酶阴性的 GNF

1. 血液杆菌属(*Haematobacter*)和冷杆菌属

血液杆菌属隶属于 α 变形菌纲，红杆菌科，包括 3 个种，即马赛血液杆菌（*Haematobacter massiliensis*）[以前称为马赛红细菌（*Rhodobacter massiliensis*）]、密苏里血液杆菌（*Haematobacter missouriensis*）及血液杆菌属基因种 1（表 46-3）[115]。这些菌种不易通过表型鉴别，甚至 16S rRNA 基因序列也非常相近。血液杆菌属不分解糖类，但是密苏里血液杆菌在低蛋白胨酚红琼脂上（见第 35 章），能够分解葡萄糖、木糖，有时分解甘露醇产酸；马赛血液杆菌不能分解糖类产酸；所有菌种都可以通过分解乙二醇产酸，脲酶和苯丙氨酸脱氨酶阳性，精氨酸双水解酶也阳性，但偶尔出现延迟反应。不解糖的血液杆菌属菌株与苯丙酮酸冷杆菌（*Psychrobacter phenylpyruvicus*）易混淆，可通过生化反应特性加以鉴别，其中不解糖的血液杆菌属菌株三丁酸甘油酯酯酶阴性，吐温 80 不促进其生长，精氨酸双水解酶阳性。不解糖的血液杆菌属菌株与粪冷杆菌（*Psychrobacter faecalis*）、肺炎冷杆菌（*Psychrobacter pulmonis*）及相关菌种的鉴别要点是其三丁酸甘油酯酯酶和吐温 80 酯酶阴性，硝酸盐还原酶阴性，精氨酸双水解酶试验阳性。

美国 CDC 接收到的菌株主要分离自脓毒症患者。有报道称一株类似血液杆菌属细菌引起主动脉瓣心内膜炎[116]。

对于血液杆菌属菌株，阿莫西林、氟喹诺酮类、氨基糖苷类和碳青霉烯类药物的 MIC 值低，而头孢菌素类、单环 β-内酰胺类和哌拉西林的 MIC 值则依菌株而定。

2. 莫拉菌属 莫拉菌属包括约 20 个有效命名的菌种。卡他莫拉菌、奥斯陆莫拉菌、非液化莫拉菌和林肯莫拉菌（*Moraxella lincolnii*）是人体呼吸道正常菌群。动物菌种包括：牛莫拉菌（*Moraxella bovis*），分离自健康的牛和包括马在内的其他动物；波伏里莫拉菌（*Moraxella boevrei*）和山羊莫拉菌（*Moraxella caprae*），分离自山羊；犬莫拉菌（*Moraxella canis*），分离自狗、猫和骆驼；豚鼠莫拉菌（*Moraxella caviae*），分离

自豚鼠；兔莫拉菌（*Moraxella cuniculi*），分离自兔；绵羊莫拉菌（*Moraxella ovis*）和伸长莫拉菌（*Moraxella oblonga*），分离自绵羊；多动物莫拉菌（*Moraxella plurianimalum*）及猪莫拉菌（*Moraxella porcinum*），分离自猪和绵羊。

表 46-3 氧化酶阳性、吲哚阴性、胰蛋白酶阴性、球形的 GNF[a]

特征	马赛血液杆菌(10)	密苏里血液杆菌(3)	亚特兰大莫拉菌(7)	犬莫拉菌(5)	卡他莫拉菌(7)	腔隙莫拉菌(5)	林肯莫拉菌(2)	非液化莫拉菌(16)	奥斯陆莫拉菌(28)	解脲寡源菌(3)	尿道寡源菌(7)	耶氏副球菌(14)	粪冷杆菌(19)	苯丙酮酸冷杆菌(5)[b]	肺炎冷杆菌(8)	血冷杆菌(15)[b]	解几丁质污蝇单胞菌(3)
动力(鞭毛)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	67(Pt)	0	0	0	0	0	0	0
麦康凯琼脂上生长	90	100	100	60	0	0	0	0	50	0	57	100	100	0	(50)	0	100
分解醋酸盐产碱	100	100	0	100	0	60	0	0	100	100	100	100	100	100	100	87	(100,w)
对去铁胺的敏感性	0	0	71	100	100	100	0	100	0	100	100	0	0	0	0	0	100
产酸																	
葡萄糖	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	100
甘露醇	0	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	(50)	0	0	0	0	0
木糖	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	(100,w)
乙二醇	100	100	0	100	0	20	0	0	100	100	100	100	100	100	100	87	100
明胶酶	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
吐温 80 酯酶	0	0	0	0	0	100	0	0	4	0	0	0	100	100	100	100	0
三丁酸酯酶	0	0	0	100	100	100	0	100	100	0	0	100	100	100	100	100	0
碱性磷酸酶	0	0	100	0	0	80	0	0	79	0	0	0	0	0	0	0	0
苯丙氨酸脱氨酶	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100,w	0	10	100	0	33	100
吡咯烷酮氨肽酶	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
脲酶	100	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	100	0	100	0
硝酸盐还原酶	0	0	0	80	100	100	0	100	18	100	0	100	100	20	100	33	0
亚硝酸盐还原酶	0	0	0	20	100	0	0	0	0	100	100	0	100	0	100	0	0
精氨酸双水解酶	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注：[a] 菌名后面括号中的数字是测试的菌株数。数值为百分率；括号中的数值代表延迟反应阳性比例。Pt. 周身鞭毛；w. 弱阳性。[b] 吐温 80 可明显促进生长。苯丙酮酸冷杆菌能够在补充 0.1%吐温 80 的 12%NaCl 胰蛋白酶大豆肉汤培养基中生长，而血冷杆菌则不能生长

卡他莫拉菌和犬莫拉菌在绵羊血琼脂（SBA）及胰蛋白酶大豆琼脂（TSA）培养基上生长良好，培养 24 h 后菌落直径可>1 mm。卡他莫拉菌的菌落在血琼脂和巧克力琼脂上生长良好，一些菌株在改良 Thayer-Martin 和其他选择性培养基上也能生长，菌落灰白色、不透明、光滑、培养 24 h 后大小为 1～3 mm，菌落显著的特征是形态非常一致，用接种环可以将整个菌落在培养基上推动，好像曲棍球一样，而且菌落可以从琼脂上完整地转移下来而不破散。大部分犬莫拉菌的菌落与肠杆菌科细菌的菌落形态相似（菌落大，光滑），在含淀粉的 MH 琼脂上生长可产生棕色素[37]。有些菌

株会形成类似肺炎克雷伯菌的黏稠菌落[37]。非液化莫拉菌的菌落光滑，透明或半透明，在SBA培养基生长24 h后，菌落直径为0.1～0.5 mm，生长48 h后菌落直径约1 mm。偶尔，这些菌落可扩散并且向琼脂下面凹陷。林肯莫拉菌[117]、奥斯陆莫拉菌和苯丙酮酸冷杆菌[之前称为苯丙酮酸莫拉菌(*Moraxella phenylpyruvica*)]的菌落形态非常相似，但极少形成凹陷。相反，腔隙莫拉菌常在琼脂上形成凹陷，菌落较小，在巧克力琼脂上可形成深色的晕。菌体呈杆状的莫拉菌属细菌，尤其是亚特兰大莫拉菌(*Moraxella atlantae*)和林肯莫拉菌，对营养要求较高，在SBA培养基上菌落更小，培养24 h后菌落直径<1 mm。亚特兰大莫拉菌的菌落较小(通常直径为0.5 mm)，呈凹陷或扩散状，胆盐能够刺激其生长，这可以解释亚特兰大莫拉菌在麦康凯培养基上的生长现象。非液化莫拉菌和奥斯陆莫拉菌的菌落很少出现凹陷，菌落比亚特兰大莫拉菌稍大些，其中非液化莫拉菌的菌落可呈黏液状。选择性培养基——乙酰唑胺琼脂可用于卡他莫拉菌的培养，空气中孵育能够抑制奈瑟菌的生长[43]。

莫拉菌属细菌呈球形或球杆形(圆胖的杆菌)，常成对排列，有时呈短链状排列，革兰染色常不易脱色[118]。犬莫拉菌和卡他莫拉菌是类似奈瑟菌样的双球菌，通过以下方法可以轻易地将两者与其他莫拉菌或者球形的菌种相鉴别：取青霉素纸片附近的培养菌落进行革兰染色，犬莫拉菌和卡他莫拉菌的菌体保持直径为0.5～1.5 μm的球形双球菌形态，大小不一，而球杆菌镜下则表现为明显的杆状和丝状的菌体形态。

莫拉菌属细菌通常不分解糖类，氧化酶强阳性。卡他莫拉菌和犬莫拉菌触酶强阳性，大多数菌株可还原硝酸盐和亚硝酸盐。通过下列试验很容易将卡他莫拉菌和犬莫拉菌与共生的奈瑟菌属(也常分离自临床的呼吸道标本)相鉴别：前两者可产生脱氧核糖核酸酶(DNA酶)和丁酸酯酶(三丁酸甘油酯试验)。快速丁酸酯酶试验参见文献报道[119]，吲哚丁酸水解斑点试验的商品化试剂市场有售(Remel, Inc., Lenexa, KS)。然而，莫拉菌属的其他一些菌种也存在丁酸酯酶。犬莫拉菌可分解乙二醇产酸，分解醋酸盐产碱，这和卡他莫拉菌相反。卡他莫拉菌和非液化莫拉菌生化反应十分相似，两者间鉴别主要依据卡他莫拉菌的形态学特征，以及亚硝酸盐还原酶和DNA酶阳性。

莫拉菌属中仅亚特兰大莫拉菌吡咯烷酮氨肽酶阳性[120]。腔隙莫拉菌是唯一具有明胶酶活性、能够水解蛋白的菌种。应用平皿培养法(见第35章)，通常2～4天内可出现明胶液化；还有一种更为快速且几乎同样特异的试验可将腔隙莫拉菌与其他莫拉菌属菌种相鉴别，即检测吐温80酯酶活性，细菌接种后通常在2天内可出现阳性结果，除了极少数奥斯陆莫拉菌的菌株外，其他菌种均为阴性。本菌属应该与冷杆菌属相鉴别，后者吐温80酯酶也是阳性，其中苯丙酮酸冷杆菌和血冷杆菌(*Psychrobacter sanguinis*)脲酶均阳性，其他冷杆菌属菌种在普通培养基(如TSA)上生长旺盛，甚至在25℃生长。

林肯莫拉菌的生化反应不活泼。

奥斯陆莫拉菌可分解醋酸盐产碱，分解乙二醇产酸，且耐受去铁胺(desferrioxamine)(250 μg/纸片)。非液化莫拉菌上述生化反应特征与奥斯陆莫拉菌正相反，另外，其硝酸盐还原酶总是阳性的。

大部分莫拉菌属细菌对青霉素及其衍生物、头孢菌素、四环素、喹诺酮类和氨基糖苷类敏感[121-122]。卡他莫拉菌大多数菌株产生可诱导的、菌细胞相关的β-内酰胺酶，而莫拉菌属其他菌种产β-内酰胺酶的报道极罕见[43,123]。卡他莫拉菌通常对下列抗菌药物敏感，包括阿莫西林/克拉维酸、超广谱和广谱的头孢菌素(如头孢呋辛、头孢噻肟、头孢曲松、头孢泊肟、头孢布烯、口服的头孢克肟和头孢克洛)、大环内酯类(如阿奇霉素、克拉霉素和红霉素)、四环素、利福平和喹诺酮类药物。但是，文献报道出现大环内酯耐药的卡他莫拉菌[124-125]。

3. 尿道寡源菌(*Oligella urethralis*)和解脲寡源菌(*Oligella ureolytica*) 寡源菌属包括2个菌种，即解脲寡源菌(之前称CDC Ⅳe群)和尿道寡源菌[之前称尿道莫拉菌(*Moraxella urethralis*)和CDC M-4群][126]，2种菌常分离于人类尿道，文献报道，它们可以引起尿路感染和血流感染[127,130]。

尿道寡源菌的菌落比奥斯陆莫拉菌小，不透明至白色。解脲寡源菌在血平板上生长缓慢，培养24 h后菌落呈针尖状，3天后则长出较大菌落。菌落呈白色、不透明、边缘整齐、不溶血。

解脲寡源菌和尿道寡源菌是菌体较小、不分

解糖类的球杆菌，能快速分解乙二醇产酸，对去铁胺敏感。解脲寡源菌大部分菌株可以通过周身鞭毛而运动，所有菌株脲酶强阳性（常在细菌接种几分钟后脲酶反应即呈阳性），且还原硝酸盐。尿道寡源菌无动力、脲酶和硝酸盐还原酶阴性、还原亚硝酸盐、苯丙氨酸脱氨酶弱阳性。支气管脓毒鲍特菌（*Bordetella bronchiseptica*）和少见贪铜菌（*Cupriavidus pauculus*）脲酶虽然也是快速阳性，但可耐受去铁胺。

尿道寡源菌和奥斯陆莫拉菌具有相似的生化反应特性，例如，聚β-羟丁酸积聚、不水解尿素，但两者可根据亚硝酸盐还原试验，以及甲酸盐、亚甲基丁二酸、脯氨酸和苏氨酸分解产碱相鉴别，尿道寡源菌全部反应均阳性[131]；此外，尿道寡源菌对去铁胺敏感，三丁酸酯酶阴性，而奥斯陆莫拉菌正相反。

尿道寡源菌对大多数抗菌药物敏感，包括青霉素，而解脲寡源菌表现出不定的药物敏感模式[121]。

4. 耶氏副球菌（*Paracoccus yeei*） 副球菌属隶属于α变形菌纲，红杆菌科。截至2017年9月，副球菌属包括48个命名的菌种，其中耶氏副球菌具有临床意义。最近，血副球菌（*Paracoccus sanguinis*）从不同患者的血液中分离出[132]。

副球菌属细菌菌落大，黏液样，产浅黄色色素。耶氏副球菌的菌体呈球形，多数为双球菌，有些为短杆菌。革兰染色检查，耶氏副球菌的显微镜下特征为菌体呈明显的O型（图46-3），这是由菌体中存在空泡或菌体周围着色所致。该菌分解糖类，脲酶阳性。

耶氏副球菌可分离自人类的各种感染伤口中[133]，文献报道还有血流感染和腹膜炎的病例描述[134-135]。

5. 冷杆菌属 截至2017年9月，冷杆菌属[136]包括38个菌种，其中只有少数几个种具有临床意义。除外苯丙酮酸冷杆菌，直到最近，分离于临床样本的冷杆菌属菌株还被认为属于静止冷杆菌（*Psychrobacter immobilis*）。但近期一项研究显示[137]，以前鉴定为静止冷杆菌的几乎所有菌株事实上属于粪冷杆菌和肺炎冷杆菌，后两者分别首次分离于鸽子和羔羊[138-139]。如果真如此，显然静止冷杆菌分离自人类是罕见的。

粪冷杆菌和肺炎冷杆菌是革兰阴性球杆菌，

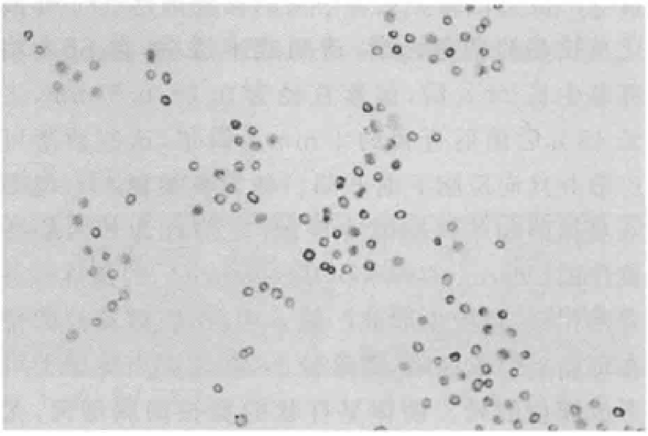


图46-3 耶氏副球菌革兰染色，图中显示的是特征性的环状形态，见彩插

在TSA培养基上呈奶油状大菌落。粪冷杆菌可分解糖类，分解葡萄糖和木糖产酸，而肺炎冷杆菌不分解糖类。两种菌都可以分解乙二醇产酸，并且吐温80酯酶、三丁酸酯酶和硝酸盐还原酶均阳性；与静止冷杆菌模式菌株不同的是，粪冷杆菌和肺炎冷杆菌两种菌脲酶阴性、亚硝酸盐还原酶阳性。2种菌的菌落形态与血液杆菌属细菌相似，但是后者硝酸盐还原酶、吐温80酯酶和三丁酸酯酶均阴性，且脲酶强阳性，精氨酸双水解酶阳性，苯丙氨酸脱氨酶阳性。

极少有关静止冷杆菌引起感染的病例报道，但是根据本章的资料，感染可能与冷杆菌属中的其他菌种有关。

虽然苯丙酮酸冷杆菌和血冷杆菌遗传学上差异大，但是表型却很相似。临床标本中血冷杆菌[140]比苯丙酮酸冷杆菌更常见，血冷杆菌分离自血液和脑膜炎患者[140-142]。事实上，大部分之前收集的苯丙酮酸冷杆菌菌株为血冷杆菌。两种菌的突出特征是吐温80可以显著地促进其生长，吐温80琼脂上的菌落大小是血平板上的2～3倍。由于两种菌在普通培养基（如TSA）上生长不良甚至完全不生长，进行去铁胺的敏感性测试和检测不同温度下肉汤中细菌生长能力时，在不使用血平板的情况下，建议培养基中补充0.1%的吐温80。

苯丙酮酸冷杆菌能够在补充0.1%吐温80的12%NaCl胰蛋白酶大豆肉汤培养基中生长，而血冷杆菌则不能生长。苯丙酮酸冷杆菌苯丙氨酸脱氨酶阳性，而血冷杆菌仅有1/3的菌株苯丙氨酸脱氨酶阳性。

大部分冷杆菌属细菌对青霉素耐药，而对其

他大多数抗菌药物敏感[121]。

6. 解几丁质污蝇单胞菌(*Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*) 污蝇单胞菌属包括3个菌种，解几丁质污蝇单胞菌和幼虫污蝇单胞菌(*Wohlfahrtiimonas larvae*)分离自苍蝇幼虫，杨树污蝇单胞菌(*W. populi*)分离自树木。解几丁质污蝇单胞菌与"*Gilardi rod* 1群"和幼虫伊格纳兹席纳菌(*Ignatzschineria larvae*)关系密切[143-144]。解几丁质污蝇单胞菌的模式菌株最初被归类为"*Gilardi rod* 1群"。

解几丁质污蝇单胞菌可能与人类蝇蛆病有关，有时可引起菌血症[145]或脓毒症[143]。文献报道，人类伤口和血液分离出15株"*Gilardi rod* 1群"菌株[146]。迄今为止，人类感染报道包括伤口感染、蜂窝织炎、骨髓炎和脓毒血症[147]。

该菌为短小球杆菌，菌落平坦，略微扩散生长，可以微弱并且缓慢地分解某些糖类产酸，如葡萄糖、木糖和果糖，苯丙氨酸脱氨酶强阳性。幼虫伊格纳兹席纳菌几丁质酶阳性，脲酶阳性。解几丁质污蝇单胞菌对青霉素耐药，而对其他多种抗菌药物敏感。

(三)氧化酶阳性、吲哚阴性、胰蛋白酶阳性的GNF

1. 胎儿别样希瓦菌(*Alishewanella fetalis*) 胎儿别样希瓦菌隶属于γ变形菌纲、交替单胞菌科(*Alteromonadaceae*)(表46-4)，是一种革兰阴性杆菌，可以在25～41℃条件下生长，最适生长温度为37℃。胎儿别样希瓦菌能够耐受8%的氯化钠浓度，而10%氯化钠时不生长，据此可与海藻希瓦菌(*Shewanella algae*)相鉴别，海藻希瓦菌在10%氯化钠条件下仍可生长[148]。与希瓦菌属(*Shewanella*)细菌相比较，胎儿别样希瓦菌在TSI和KIA底部不产生H_2S，测试的模式菌株分解葡萄糖产酸、不水解七叶苷。

在希瓦菌属的6个菌种中，胎儿别样希瓦菌是唯一从临床样本中分离出来的，分离自胎儿尸检样本，其与临床感染的关系不确定[148]。

2. 黏泥异地菌(*Inquilinus limosus*) 异地菌属(*Inquilinus*)包括2个菌种，黏泥异地菌是一种革兰阴性杆菌，菌体宽1.5～2..0 μm，长3.5 μm，在35～41℃条件下生长，但在25℃生长不良。菌落不产生色素，非常黏稠，在普通培养基(如TSA)上可以生长。一些菌株可以通过单端或双端鞭毛运动，但由于菌落黏稠，很难观察到运动现象。与最初的文献描述不同[149]，黏泥异地菌可以分解葡萄糖、甘露醇、木糖和其他糖类产酸，不能分解乙二醇产酸；β-半乳糖苷酶、吡咯烷酮氨肽酶和胰蛋白酶阳性，而碱性磷酸酶阴性；可水解七叶苷；所有的菌株触酶、β-葡糖苷酶、脯氨酸氨肽酶和吡咯烷酮氨肽酶阳性；赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、反硝化作用和产吲哚阴性[149]。

黏泥异地菌与鞘氨醇杆菌属细菌的鉴别要点是黏泥异地菌缺乏碱性磷酸酶活性，可分解甘露醇产酸；食醇鞘氨醇杆菌(*Sphingobacterium spiritivorum*)也分解甘露醇，与异地菌属细菌不同的是，食醇鞘氨醇杆菌可分解乙二醇产酸。黏泥异地菌与放射根瘤菌(*Rhizobium radiobacter*)、芦苇潘诺尼亚杆菌(*Pannonibacter phragmitetus*)的鉴别要点是黏泥异地菌不能分解乙二醇产酸(大部分芦苇潘诺尼亚杆菌菌株可以分解乙二醇)，缺乏硝酸盐还原酶活性。

由于黏泥异地菌尚未包括在商品化鉴定试剂盒的数据库中，该菌仍难以鉴定，且其黏液状的菌落常与黏液样的铜绿假单胞菌相混淆[150]。但MALDI-TOF MS系统可以准确鉴定该菌[151-152]。黏泥异地菌分离株可以在含黏菌素的洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)选择性培养基上生长，而在洋葱伯克霍尔德菌选择性琼脂上受抑制，这是由于琼脂中也含有庆大霉素[153]。

据报道，黏泥异地菌所有分离株对青霉素类、头孢菌素类、卡那霉素、妥布霉素、黏菌素、多西环素和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑耐药，对亚胺培南和环丙沙星敏感[150,153]。

黏泥异地菌可分离于土壤样本和囊性纤维化患者的呼吸道分泌物[150,153-157]。黏泥异地菌慢性定植造成的临床影响仍不清楚。根据Chiron等[153]报道的一个病例，黏泥异地菌是痰中分离出的唯一潜在病原菌，感染该菌后，患者的肺功能开始恶化。

3. 拟香味类香味菌(*Myroides odoratimimus*)和香味类香味菌(*Myroides odoratus*) 类香味菌属包括10个菌种，其中棕色类香味菌(*Myroides phaeus*)[158]、仁济类香味菌(*Myroides injenensis*)[159]、拟香味类香味菌[160]和香味类香味菌[以前称为香味黄杆菌(*Flavobacterium odora-*

tum)[160]]可分离于临床样本，后2个菌种具有临床意义。拟香味类香味菌和香味类香味菌的菌体细长，中等大小(宽0.5 μm，长1～2 μm)，无动力，2个菌种都可以滑移运动，扩展样菌落可散发典型的水果香味，这与粪产碱杆菌(*Alcaligenes faecalis*)的气味相似。尽管类香味菌属产生的黄色素不如金黄杆菌属明显，但颜色也属于屈挠菌素型(flexirubin)。

类香味菌属细菌可以在大多数的培养基上生长，包括麦康凯培养基。细菌在18～37℃可以生长，但是在41℃不生长。类香味菌属细菌不分解糖类，脲酶阳性，硝酸盐还原酶阴性，可以还原亚硝酸盐。2个菌种的鉴别方法是：香味类香味菌对去铁胺敏感，而拟香味类香味菌则耐受；此外，2种菌的菌体脂肪酸模式也完全不同，拟香味类香味菌有大量的C13：0*i* 和C15：0[160]。MALDI-TOF MS系统能够明确区分拟香味类香味菌和香味类香味菌，而VITEK 2系统无法区分这两种菌[161]。

据报道，香味类香味菌主要分离于尿，也可分离于伤口、痰、血液和耳分泌物，引起脓毒性休克、心包积液、坏死性筋膜炎和蜂窝织炎[162-166]。拟香味类香味菌曾引起暴发性丹毒和脓毒症，院内尿路感染的暴发及猪咬伤后引发的软组织感染[167-170]。美国已报道48例类香味菌属细菌感染[171]。类香味菌属大部分菌株对青霉素类、头孢菌素类、氨基糖苷类、氨曲南和碳青霉烯类药物耐药[163,172]。一株多重耐药的拟香味类香味菌基因组分析见文献报道[173]。

一株仁济类香味菌对多种抗菌药物表现出高水平耐药[174]，该菌分离自一例发热伴突发左肾排尿功能下降的急诊室就诊患者[159]。

4. 人苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropi*)和中间苍白杆菌(*Ochrobactrum intermedium*) 苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)、假苍白杆菌属(*Pseudochrobactrum*)、类苍白杆菌属(*Paenochrobactrum*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)和潘诺尼亚杆菌属(*Pannonibacter*)在形态学和生化反应特性上有很多共同点，这些菌属分类的其他特征见表46-4。

苍白杆菌属目前包括20多个菌种，其中有2个菌种分离于人类，即人苍白杆菌[175]和中间苍白杆菌[176]，近期还有一些新的菌种从临床标本中分离，如嗜血苍白杆菌(*Ochrobactrum haematophilum*)[177]、假格里朗苍白杆菌(*Ochrobactrum pseudogrignonense*)[177]及假中间苍白杆菌(*Ochrobactrum pseudintermedium*)[178]。人苍白杆菌[175]包括一些脲酶阳性的无色杆菌属菌种，这些细菌之前命名为CDC Ⅴd群(生物型1和2)以及无色杆菌A、C和D群。

苍白杆菌属细菌在SBA培养基上生长的菌落细小，过夜培养后直径大约1 mm，培养2天后菌落变大，呈奶油样、光滑、圆形、边界清晰。该菌属细菌为中等长度的革兰阴性杆菌，虽然它可以通过周身鞭毛运动，但是大部分菌体只有一或两根很长的侧鞭毛。

苍白杆菌属细菌胰蛋白酶和吡咯烷酮氨肽酶强阳性，能分解糖类，可快速分解葡萄糖和木糖产酸，分解甘露醇产酸不定(通常为迟缓阳性)，分解乙二醇产酸，大部分菌种脲酶阳性，苯丙氨酸脱氨酶常阳性，硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶阳性(嗜血苍白杆菌除外)。中间苍白杆菌与人苍白杆菌的鉴别要点是：中间苍白杆菌对黏菌素耐药，可以在41℃生长，脲酶通常阴性或迟缓反应。假中间苍白杆菌是唯一可在45℃生长的菌种。对黏菌素、四环素和氨基糖苷类耐药，这些特性可用于中间苍白杆菌与假中间苍白杆菌间的相互鉴别。在氨基糖苷类药物中，奈替米星对2种菌的鉴别效果最好。布鲁菌科的系统发育比较学揭示了毒力进化途径[179]。

人苍白杆菌存在于各种环境中和人类，主要分离自导管相关的菌血症患者[175,180]，很少引起其他类型的感染(文献有新生儿脓毒症、肺炎、骨髓炎和心内膜炎的病例报道)[181-184]，有文献报道人苍白杆菌引起器官移植患者医院感染的暴发[185]，也有文献报道一些中间苍白杆菌感染病例[186]，但是由于人苍白杆菌和中间苍白杆菌表型相近，某些考虑为人苍白杆菌引起的感染实际上可能是由中间苍白杆菌引起[187]。最近，有文献报道检测到中间苍白杆菌的几种毒力因子[188]。

人苍白杆菌通常对β-内酰胺类耐药，如广谱青霉素类、广谱头孢菌素类、氨曲南和阿莫西林/克拉维酸，而常对氨基糖苷类、喹诺酮类、亚胺培南、四环素和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑敏感[180]。有文献报道检测到万古霉素耐药的人苍白杆菌[189]。

表 46-4　氧化酶阳性、吲哚阴性、胰蛋白酶阳性的 GNF[a]

特征	胎儿别样希瓦菌(1)	黏泥异地菌(3)	拟香味类香味菌(21)	仁济类香味菌(2)[b]	香味类香味菌(4)	人苍白杆菌(29)	格里朗苍白杆菌(2)	嗜血苍白杆菌(3)	中间苍白杆菌(9)	假中间苍白杆菌(1)	假格里朗苍白杆菌(2)	芦苇潘诺尼亚杆菌(7)	不解糖假苍白杆菌(3)	放射根瘤菌(22)	海藻希瓦菌(10)[c]	腐败希瓦菌(2)[c]	蜂窝织炎鞘氨醇杆菌(2)[d]	和田鞘氨醇杆菌(1)[e]	多食鞘氨醇杆菌(7)	食醇鞘氨醇杆菌(4)	嗜温鞘氨醇杆菌(3)	鞘氨醇单胞菌(15)
动力	0	33	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	0	0	0	0	0	66
鞭毛	0	P,1	0	0	0	Pt,L	Pt,L	Pt,L	Pt,L	Pt,L	Pt,L	Pt,L	0	Pt,L	P,1	P,1	ND	ND	0	0	0	P,1
产屈挠菌素型色素	0	0	95	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	ND	0	0	0	0	0
麦康凯琼脂上生长	100	(100)	100	ND	75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	ND	100	(50)	100	0
41℃生长	ND	ND	ND	100	ND	0	0	100	100	100	0	100	0	0	ND	ND	0	100	ND	ND	ND	ND
45℃生长	ND	ND	ND	100	ND	0	0	0	0	100	0	0	0	0	ND	ND	0	100	ND	ND	ND	ND
分解产酸：																						
葡萄糖	100	100	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	(100)	100	0	50	0	0	100	100	100	87(13)
甘露醇	0	100	0	0	0	59	50	33	33	0	50	28	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0
木糖	0	100	0	ND	0	100	100	100	100	100	100	100	(100)	100	0	0	100	ND	100	100	100	87
乙二醇	0	0	0	ND	0	100	100	100	100	100	100	86	86	100	100	100	ND	ND	0	100	0	93
水解七叶苷	0	100	0	ND	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	100	0	100	100	100	100
明胶酶	100	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0
脲酶	100	(33)	100	100	100	100	0	100	(44)	0	(100)	100	0	100	0	0	0	0	100	100	(100)	0
硝酸盐还原酶	100	0	0	0	0	100	100	0	100	100	100	100	0	100	100	100	0	0	0	0	100	7
亚硝酸盐还原酶	0	0	100	ND	100	100	100	0	100	100	100	100	0	64	100	100	ND	ND	0	0	0	0
β-半乳糖苷酶（ONPG[f]）	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	100	0	100	75	100	100
吡咯烷酮氨肽酶	0	100	100	ND	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	ND	ND	100	100	100	27
产 H_2S（在 KIA 上）	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	ND	0	0	0	0	0

（续　表）

特征	胎儿别样希瓦菌(1)	黏泥异地菌(3)	拟香味类香味菌(21)	仁济类香味菌(2)[b]	香味类香味菌(4)	人苍白杆菌(29)	格里朗苍白杆菌(2)	嗜血苍白杆菌(3)	中间苍白杆菌(9)	假中间苍白杆菌(1)	假格里朗苍白杆菌(2)	芦苇潘诺尼亚杆菌(7)	不解糖假苍白杆菌(3)	放射根瘤菌(22)	海藻希瓦菌(10)[c]	腐败希瓦菌(2)[c]	蜂窝织炎鞘氨醇杆菌(2)[d]	和田鞘氨醇杆菌(1)[e]	多食鞘氨醇杆菌(7)	食醇鞘氨醇杆菌(4)	嗜温鞘氨醇杆菌(3)	鞘氨醇单胞菌(15)
碱性磷酸酶	100	0	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	ND	100	100	100	100	100
NaCl 需求	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
苯丙氨酸脱氨酶	ND	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100	100	100	0	100	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
三丁酸酯酶(<1 h)	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0	0	0	0	100	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
药物敏感性																						
黏菌素	100	0	0	ND	0	100	50	100	0	0	0	0	0	73	60	100	100[g]	ND	0	0	0	7
去铁胺	100	0	0	ND	100	0	100	33	0	0	100	100	100	18	0	0	ND	ND	0	0	0	7
奈替米星	ND	ND	ND	ND	ND	100	100	100	0	100	100	100	66	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
四环素	ND	ND	ND	ND	ND	100	100	100	100	0	100	100	100	100	ND	ND	100[g]	0	ND	ND	ND	ND

注：[a] 菌名后括号内数字代表测试的菌株数。数值为百分率，括号内数值代表延迟反应阳性比例。L. 侧面；ND. 无数据；P. 极性；Pt. 周身鞭毛。[b] 数据参见参考文献[159]。[c] 希瓦菌属两种菌都是乌氨酸脱羧酶阳性。[d] 数据参见参考文献[212]。[e] 数据参见参考文献[293]。[f] ONPG. 邻-硝基苯-β-D-半乳糖苷。[g] 仅测试模式菌种

5. 芦苇潘诺尼亚杆菌 潘诺尼亚杆菌属隶属于α变形菌纲、红杆菌科，目前包括2个菌种，即芦苇潘诺尼亚杆菌和印度潘诺尼亚杆菌（*Pannonibacter indicus*），均存在于环境中。芦苇潘诺尼亚杆菌之前命名为无色杆菌B群和E群[190]，该菌与放射根瘤菌最相近，但是其糖分解活性较弱，分解糖的种类少。与苯丙氨酸脱氨酶阳性的放射根瘤菌属、苍白杆菌属和假苍白杆菌属细菌不同的是，芦苇潘诺尼亚杆菌不能利用苯丙氨酸产生苯丙酮酸。另一个简单、可靠的鉴别试验是三丁酸甘油酯水解试验，芦苇潘诺尼亚杆菌在30 min内出现阳性，而放射根瘤菌需培养数小时或过夜才会转为阳性，甚至一直保持阴性，苍白杆菌属和假苍白杆菌属细菌不能水解三丁酸甘油酯。此外，芦苇潘诺尼亚杆菌可以在41℃生长，而放射根瘤菌则不能。

文献报道，无色杆菌B群可引起脓毒症[191]，芦苇潘诺尼亚杆菌可引起肝脓肿[192]。

6. 假苍白杆菌属 2006年文献描述了假苍白杆菌属[193]，该属包括5个菌种，解糖假苍白杆菌（*Pseudochrobactrum saccharolyticum*）和不解糖假苍白杆菌（*Pseudochrobactrum asaccharolyticum*）位列其中。不解糖假苍白杆菌模式菌株分离自膝关节抽取物，还有2株来源于人类的菌株分离自比利时的临床样本：一个是伤口，另一个是眼拭子（未发表的数据）。解糖假苍白杆菌和不解糖假苍白杆菌两个菌种与苍白杆菌属细菌非常相近，只是菌体无动力。不解糖假苍白杆菌可以缓慢地分解葡萄糖和木糖产酸，解糖假苍白杆菌分解糖的能力则更强。2个菌种对去铁胺敏感，不产生脲酶，硝酸盐还原酶和亚硝酸盐还原酶阴性。假苍白杆菌属的临床意义有待评估。

7. 放射根瘤菌和普萨根瘤菌（*Rhizobium pusense*） 以前土壤杆菌属包括一些植物病原体，广泛分布于世界各地的土壤中。现在土壤杆菌属包括4个不同的菌种：放射土壤杆菌（*Agrobacterium radiobacter*）[之前的根癌土壤杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）和CDC Ⅴd-3群]、产根土壤杆菌（*Agrobacterium rhizogenes*）[后来被调整到鞘氨醇单胞菌属，称为玫瑰鞘氨醇单胞菌（*Sphingomona rosa*）]、葡萄土壤杆菌（*Agrobacterium vitis*）及悬钩子土壤杆菌（*Agrobacterium rubi*）。最近，一项修订提议将土壤杆菌属的所有菌种归入根瘤菌属（隶属于α变形菌纲、根瘤菌科）[194]，而其中仅放射根瘤菌具有临床意义。但最近有报道称，普萨根瘤菌是与临床关系最为密切的根瘤菌属细菌[195]。

放射根瘤菌和普萨根瘤菌的菌落呈圆形、凸起、光滑、不产生色素，在SBA培养基上呈浅米色，培养48 h后菌落直径为2 mm。在麦康凯培养基上延长培养后，菌落外观湿润，呈粉红色黏液状，菌体大小为(0.6～1.0)μm×(1.5～3.0)μm，常单个或成对出现。

放射根瘤菌的最适生长温度是25～28℃，35℃也可以生长，但41℃时不能生长。虽然放射根瘤菌表型与苍白杆菌属细菌非常相近，但是从系统发育上存在很大的差别。普萨根瘤菌表型和放射根瘤菌非常相近，但是两者可通过16S rRNA和*atpD*基因测序区分开[195]。

放射根瘤菌和普萨根瘤菌明显区别于苍白杆菌属细菌的生化反应是β-半乳糖苷酶试验阳性，可以产生酮内酯，但后者并不常规检测。放射根瘤菌具有广泛的糖分解能力，包括甘露醇和棉子糖。

放射根瘤菌（可能错误地鉴定为普萨根瘤菌）最常见于血液，其次是腹膜透析液、尿、腹腔积液[196]、心内膜炎[197]和角膜炎[198]。此菌种也可分离于囊性纤维化患者的呼吸道[149]。个别菌株分离于经皮肤插管或者植入生物医学假体的患者，此时往往需要移除这些装置才能获得有效的治疗效果。放射根瘤菌大部分菌株对广谱的头孢菌素类、碳青霉烯类、四环素类和庆大霉素敏感，但对妥布霉素不敏感[196,199]。建议对临床意义明确的分离菌株进行检测。

8. 海藻希瓦菌和腐败希瓦菌（*Shewanella putrefaciens*） 以前的腐败假单胞菌（*Pseudomonas putrefaciens*）、腐败交替单胞菌（*Alteromonas putrefaciens*）、腐败无色杆菌（*Achromobacter putrefaciens*）和CDC Ⅰb群现已被归入希瓦菌属，该菌属包括50多个菌种。腐败希瓦菌有2个CDC生物型，CDC生物1型后来被描述为严格意义上的腐败希瓦菌，而CDC生物2型后来被命名为一个新的菌种，即海藻希瓦菌（*Shewanella algae*）。需注意的是，海藻希瓦菌最初的拉丁名为“*Shewanella alga*”[200]，随后被修正为“*Shewanella algae*”。

希瓦菌属细菌在 SBA 培养基上的菌落外观凸起，呈圆形、光滑，有时呈黏液状，可产生棕色或褐色的可溶性色素，使培养基变色呈现绿色。菌体长短不一或细丝状，与类香味菌属细菌类似。具有单极鞭毛，有动力。

海藻希瓦菌和腐败希瓦菌两种菌的大部分菌株在 KIA 和 TSI 琼脂上产生 H_2S，在与临床相关的 GNF 中，这是一个独特的特征。2 种菌鸟氨酸脱羧酶阳性，碱性磷酸酶强阳性，胰蛋白酶强阳性，吡咯烷酮氨肽酶强阳性。海藻希瓦菌嗜盐，不分解糖类，生长时需要氯化钠，在 TSA 培养基生长需要补充 0.5% 的氯化钠。腐败希瓦菌生长不需要氯化钠，能分解糖类，可分解麦芽糖和蔗糖产酸，分解葡萄糖产酸弱或不定。

Khashe 和 Janda[201] 研究报道，从人类分离的临床菌株主要是海藻希瓦菌（77%），而非人类来源的分离株大多数是腐败希瓦菌（89%）。尽管在临床实验室中，腐败希瓦菌和海藻希瓦菌分离不常见，但是它们可见于各种临床标本，并且与人类多种感染有关[202]，包括皮肤和软组织感染、中耳炎、眼部感染、骨髓炎、腹膜炎和脓毒症。海藻希瓦菌在自然界中主要存在于盐水中，而腐败希瓦菌主要分离于鱼类、家禽和肉类，以及淡水和海水样本。最近，海藻希瓦菌临床相关性综述已见发表[203]。

希瓦菌属细菌通常对抗革兰阴性杆菌的大部分抗菌药物敏感，青霉素和头孢噻吩除外[121,199]。青霉素、氨苄西林和四环素对海藻希瓦菌的 MIC 均值高于腐败希瓦菌[201]。

9. 鞘氨醇杆菌属中吲哚阴性菌种 截至 2017 年 9 月，鞘氨醇杆菌属共包括 43 个菌种。根据 16S rRNA 基因测序，吲哚阳性的水谷鞘氨醇杆菌（*Sphingobacterium mizutaii*）也归入该菌属，因此鞘氨醇杆菌属的描述由吲哚阴性修订为吲哚不确定性[204]。水谷鞘氨醇杆菌吲哚阳性，因此被列入表 46-5 吲哚阳性的 GNF 中。

表 46-5 氧化酶阳性、吲哚阳性的 GNF[a]

特征	阿尔卑斯浴者菌(1)	动物溃疡伯杰菌(10)	人金黄杆菌(11)[b]	黏金黄杆菌(11)	人型金黄杆菌(14)[b]	产吲哚金黄杆菌(15)	特里维斯金黄杆菌(5)[b]	脑膜脓毒伊丽莎白金菌(17)	按蚊伊丽莎白金菌(1)[c]	短稳杆菌(7)	水谷鞘氨醇杆菌(5)	法氏沃氏菌(53)	有毒威克斯菌(10)
动力	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β-溶血（SBA 平皿培养 3 天后）	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
产屈挠菌素型色素	0	0	0	100	0	74	0	0	0	0	0	0	0
产其他色素[d]	PY	—	—/PS	—	—/PY	—	PY	—/PY/PS	PY	PY	PY	—/PY	—
麦康凯琼脂上生长	0	0	0	100	0	67	0	83	100	100	0	100	0
41℃生长	0	0	0	100	0	0	0	47	0	0	0	0	100
产酸：													
葡萄糖	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
甘露醇	100	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0
木糖	0	0	0	27	0	0	0	0	0	0	100	0	0
L-阿拉伯糖	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	80	0	0
麦芽糖	100	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
蔗糖	0	0	0	0	28	20	0	0	0	0	100	0	0
乙二醇	0	0	0	100	100	0	0	100	0	0	0	47	0
水解七叶苷	0	0	0	100	100	100	20	100	100	0	100	53	0
明胶酶	0	100	100	100	100	100	0	100	0	100	0	53/(47)	100
脲酶	0	100	0	73	0	0	0	0[e]	0	0	0	100	0

（续　表）

特征	阿尔卑斯浴者菌(1)	动物溃疡伯杰菌(10)	人金黄杆菌(11)[b]	黏金黄杆菌(11)	人型金黄杆菌(14)[b]	产吲哚金黄杆菌(15)	特里维斯金黄杆菌(5)[b]	脑膜脓毒伊丽莎白金菌(17)	按蚊伊丽莎白金菌(1)[c]	短稳杆菌(7)	水谷鞘氨醇杆菌(5)	法氏沃氏菌(53)	有毒威克斯菌(10)
硝酸盐还原酶	100	0	0	73	65	26	60	0	ND	0	0	0	0
亚硝酸盐还原酶	0	0	0	54	65	13	100	88	ND	0	80	34	0
β-半乳糖苷酶（ONPG[f]）	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	100	19	0
苯甲基精氨酸氨肽酶（胰蛋白酶）	0	100	100	100	100	100	80	100	ND	100	100	100	100
吡咯烷酮氨肽酶	0	0	91	100	100	100	80	100	ND	100	100	100	100
对以下敏感：													
黏菌素/多黏菌素	100	0	0	0	14	0	0	0	ND	0	0	0	100
去铁胺	100	100	73	0	0	0	100	0	ND	0	0	15	100

注：[a] 菌名后括号中的数字代表测试的菌株数。数值是百分率；括号中的数值代表延迟反应阳性比例。缩略语：ND. 无数据。[b] 人金黄杆菌和人型金黄杆菌分解醋酸盐产碱阳性，特里维斯金黄杆菌分解醋酸盐产碱阴性。[c] 数据参见参考文献[250]。[d] 缩略语和符号：一，无；PS. 浅橙红色；PY. 浅黄色。[e] 和平空间站伊丽莎白金菌脲酶阳性（数据参见参考文献[244]）。[f]ONPG. 邻-硝基苯-β-D-半乳糖苷

临床标本中分离的鞘氨醇杆菌属各菌种包括：多食鞘氨醇杆菌（*Sphingobacterium multivorum*）[之前称为多食黄杆菌（*Flavobacterium multivorum*）和 CDC Ⅱk-2 群]、食醇鞘氨醇杆菌（*Sphingobacterium spiritivorum*）[包括之前称为食神黄杆菌（*Flavobacterium spiritivorum*）、薮内黄杆菌（*Flavobacterium yabuuchiae*）和 CDC Ⅱk-3 群的菌种]、嗜温鞘氨醇杆菌（*Sphingobacterium thalpophilum*）、和田鞘氨醇杆菌（*Sphingobacterium hotanense*）、蜂窝织炎鞘氨醇杆菌（*Sphingobacterium cellulitidis*）及水谷鞘氨醇杆菌[205-206]。

鞘氨醇杆菌属细菌的菌落呈浅黄色，菌体中等大小，无动力，革兰阴性杆菌。所有菌种都能分解糖类，如分解葡萄糖、木糖和其他一些糖类产酸，除食醇鞘氨醇杆菌外，其他各菌种均不分解甘露醇产酸，而食醇鞘氨醇杆菌也是唯一分解乙二醇产酸的菌种。嗜温鞘氨醇杆菌与其他菌种的鉴别要点是：嗜温鞘氨醇杆菌可还原硝酸盐，并且能在 41℃生长。

多食鞘氨醇杆菌、食醇鞘氨醇杆菌与少动鞘氨醇单胞菌（*Sphingomonas paucimobilis*）（之前称为 CDC Ⅱk-1 群）的鉴别要点是：前两者无动力，脲酶阳性，对多黏菌素耐药。其他鞘氨醇单胞菌属的一些菌株也对黏菌素耐药。

多食鞘氨醇杆菌是最常见于人类感染的菌种。从各种临床标本中均分离出该菌，但该菌很少和患有严重合并症的重症感染（脓毒症、腹膜炎终末期肾病和坏死性筋膜炎）相关[207-210]。血液和尿是食醇鞘氨醇杆菌常分离的部位[211]。嗜温鞘氨醇杆菌分离于伤口、血液、眼分泌物、脓肿和 1 例腹部切口[46]。和田鞘氨醇杆菌分离于 1 例菌血症[210]，蜂窝织炎鞘氨醇杆菌分离于各种临床标本[212]。

鞘氨醇杆菌属细菌通常对氨基糖苷类和多黏菌素 B 耐药，体外对喹诺酮类和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑敏感。其对 β-内酰胺类的敏感性不定，需要对单个分离菌株进行药敏试验[122]。

10. 鞘氨醇单胞菌属（*Sphingomonas*） 基于 16S rRNA 基因序列、独特的神经鞘糖脂和泛醌类型，以前称为少动假单胞菌（*Pseudomonas paucimobilis*）和 CDC Ⅱk-1 群的细菌重新创建新属——鞘氨醇单胞菌属，它隶属于 α 变形菌纲，鞘氨醇单胞菌科[213-214]。起初，鞘氨醇单胞菌属分为 4 个聚类群，分别对应一个不同的菌属[215]，修订后该属至少包括 12 个菌种，其中只有少动鞘氨醇单胞菌和类少动鞘氨醇单胞菌（*Sphingomonas parapaucimobilis*）具有重要的临床意义。然而，近期（Wauters 未发表）对临床分离的 12 株鞘氨醇单胞菌进行 16S rRNA 基因测序，发现它们分属于已经命名的和未命名的鞘氨醇单胞菌属各菌种，其中没有少动鞘氨醇单胞菌，仅有 2 株类少动鞘氨醇单胞菌。由于这些菌种具有很多共同的表型特征，常规实验室最好将其报道为鞘

氨醇单胞菌属。

鞘氨醇单胞菌属细菌在血平板上生长缓慢，培养 24 h 后出现细小的菌落。最适生长温度 30℃，37℃可生长而 41℃则不生长。几乎所有菌株都可以产生黄色的非水溶性色素，不同于屈挠菌素型色素，可以通过 KOH 试验进行鉴别[2]（译者注：滴加 20%KOH 溶液于菌落表面，产屈挠菌素型色素的菌落颜色立即由黄色或橘黄色转变为红色、紫色或棕色，当加入酸性溶液中和过量的 KOH 时，菌落又可以恢复为原来的颜色），少数菌株无色素或培养数天后产生浅黄色素。陈旧的菌落会产生深黄（芥黄）色素。

鞘氨醇单胞菌属细菌为中等或长的、有动力的杆菌，具有单端鞭毛，18～22℃时有动力，而 37℃时动力消失。然而，在肉汤培养基中很少有菌体表现出动力活性，因此很难证实其具有此特性。

鞘氨醇单胞菌属氧化酶弱阳性或阴性，所有的菌株都可以分解糖类，有些菌株分解葡萄糖产酸作用弱并且迟缓，脲酶阴性，极个别菌株硝酸盐还原阳性，可水解七叶苷，β-半乳糖苷酶和碱性磷酸酶阳性。当生化反应使用硝基苯基化合物底物时，有些菌株的黄色素可能会影响试验结果中黄色变换的正确判读。

鞘氨醇单胞菌属细菌可以分解芳香族化合物，故常用于生物除污。鞘氨醇单胞菌属细菌广泛分布于环境中，包括水。

少动鞘氨醇单胞菌可分离于各种临床标本，包括血液、脑脊液、尿、伤口、阴道和子宫颈分泌物，也可以从医院环境中分离[216-220]。类少动鞘氨醇单胞菌分离于痰、尿和阴道标本中[214]。据文献报道，韩国鞘氨醇单胞菌（*Sphingomonas koreensis*）引起 1 例腹膜炎病例[221]。

鞘氨醇单胞菌属大部分菌株对黏菌素耐药，但所有菌株对万古霉素敏感，这对于革兰阴性非发酵杆菌而言实属特例。这种情况在其他菌属中仅见于金黄杆菌属及其相关的菌属如伊丽莎白金菌属和稳杆菌属。鞘氨醇单胞菌属大部分菌株对四环素、氯霉素、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑和氨基糖苷类药物敏感。其对其他抗菌药物包括氟喹诺酮类的敏感性因菌株不同而异[121,216]。

（四）氧化酶阳性、吲哚阳性的 GNF

大多数氧化酶阳性、吲哚阳性的 GNF 广泛分布于土壤、植物、食物、水源及医院环境中（表 46-5）。与临床有关的菌种包括阿尔卑斯浴者菌（*Balneatrix alpica*）、动物溃疡伯杰菌（*Bergeyella zoohelcum*）、金黄杆菌属、脑膜脓毒伊丽莎白金菌、按蚊伊丽莎白金菌（*Elizabethkingia anophelis*）、短稳杆菌（*Empedobacter brevis*）、水谷鞘氨醇杆菌、法氏沃氏菌（*Wautersiella falsenii*）及有毒威克斯菌（*Weeksella virosa*）。除动物溃疡伯杰菌吡咯烷酮氨肽酶阴性，阿尔卑斯浴者菌胰蛋白酶和吡咯烷酮氨肽酶阴性外，以上其他所有菌种吲哚、胰蛋白酶、吡咯烷酮氨肽酶和碱性磷酸酶均阳性。表 46-5 列出了鉴别这些菌种的各种生物学特征。

1. 阿尔卑斯浴者菌 浴者菌属仅有 1 个菌种，即阿尔卑斯浴者菌，该菌在培养基上形成直径 2～3 mm、凸起、光滑的菌落。培养 2～3 天后，菌落中心呈浅黄色，培养 4 天后呈浅棕色。阿尔卑斯浴者菌是直或弯曲的革兰阴性杆菌，在临床相关的吲哚阳性 GNF 中，阿尔卑斯浴者菌是唯一具有动力的菌种，具有单极或双极鞭毛。

阿尔卑斯浴者菌专性需氧，可分解糖类，与其他吲哚阳性的 GNF 的不同点是：阿尔卑斯浴者菌胰蛋白酶和吡咯烷酮氨肽酶均呈阴性。在 20～46℃条件下，阿尔卑斯浴者菌可在普通培养基（如 TSA）上生长，但在麦康凯培养基上不生长，且分解果糖、葡萄糖、甘油、肌醇、麦芽糖、甘露醇、甘露糖、山梨醇及木糖产酸，硝酸盐还原酶呈阳性、明胶酶呈弱阳性，这些特性与脑膜脓毒伊丽莎白金菌相似，可根据动力、硝酸盐还原酶和无 β-半乳糖苷酶，将其与脑膜脓毒伊丽莎白金菌相鉴别。

阿尔卑斯浴者菌于 1987 年首次分离于肺炎和脑膜炎暴发人群中，这些患者都曾在法国南部洗浴过温泉（37℃）[222]。从 8 例患者的血液、脑脊液和痰标本中分离到该菌，还有 1 株菌分离于水中。很少从人类临床标本中分离到该菌。

2. 动物溃疡伯杰菌 伯杰菌属包括 2 个菌种，猪伯杰菌（*Bergeyella porcorum*）[223]和动物溃疡伯杰菌。动物溃疡伯杰菌包括之前的 CDC Ⅱj 群菌株[224]。

动物溃疡伯杰菌和有毒威克斯菌形态学和生化反应特性相似，菌体大小 0.6 μm×（2～3）μm，两边平行，两端钝圆。动物溃疡伯杰菌菌落外观黏稠，呈棕褐色或黄色。

动物溃疡伯杰菌和有毒威克斯菌在麦康凯琼

脂上不生长，不分解糖类，两者均对去铁胺敏感，并且对青霉素敏感，这一不同寻常的特性使其易于与相关菌属金黄杆菌属和鞘氨醇杆菌属相鉴别。动物溃疡伯杰菌与有毒威克斯菌的鉴别要点是：前者吡咯烷酮氨肽酶阴性，脲酶强阳性，对黏菌素耐药。

动物溃疡伯杰菌主要分离于动物（多数是狗）咬伤的伤口，可导致脑膜炎、脓毒症和菌血症[224-227]。动物溃疡伯杰菌和有毒威克斯菌对大多数抗菌药物敏感，但目前尚无特效抗菌药物推荐用于治疗，因此对于有临床意义的菌株需要进行药敏试验。

3. 金黄杆菌属 金黄杆菌属有100多个菌种，之前的CDC Ⅱb群包含其中，CDC Ⅱb群包括产吲哚金黄杆菌（*Chryseobacterium indologenes*）、黏金黄杆菌（*Chryseobacterium gleum*）及其他一些可能尚未分类命名的菌种。

CDC Ⅱb群细菌是无动力的杆菌。产吲哚金黄杆菌与人金黄杆菌（*Chryseobacterium anthropi*）、人型金黄杆菌（*Chryseobacterium hominis*）、脑膜脓毒伊丽莎白金菌及水谷鞘氨醇杆菌的菌体类似，即菌体中心薄、周边厚，包括丝状形态。

CDC Ⅱb群细菌氧化酶和触酶均阳性，产屈挠菌素型色素[2]，可适度地分解糖类，水解七叶苷和明胶。产吲哚金黄杆菌和黏金黄杆菌可根据以下4个特性相互鉴别：产吲哚金黄杆菌在SBA培养基37℃孵育3天，可出现宽的β溶血环，不分解阿拉伯糖，不分解乙二醇产酸，41℃不生长；黏金黄杆菌可产生明显的α溶血，类似草绿色变色，分解乙二醇产酸，分解或迟缓分解阿拉伯糖，41℃可生长。

CDC Ⅱb群其他菌不出现或罕见β溶血，因此β溶血对于鉴别产吲哚金黄杆菌几乎是特异的，黏金黄杆菌的特征与该群的其他菌株相似。需要注意的是，有些产吲哚金黄杆菌菌株不产生屈挠菌素型色素。

在CDC Ⅱb群细菌中，产吲哚金黄杆菌最常分离于临床标本。据报道，产吲哚金黄杆菌引起呼吸机相关性肺炎约有10例[228-231]，产吲哚金黄杆菌引起的其他医院感染与住院期间使用留置器械有关[232-236]。此外，产吲哚金黄杆菌与新生儿脑膜炎的发病有关[237-238]。分离自囊性纤维化患者[239]及伤口标本[240]的2株多重耐药菌的全基因组测序数据显示出现了抗生素耐药的病原体[239]。

产吲哚金黄杆菌和其他CDC Ⅱb群菌株常规方法难以鉴别区分。目前，已有文献详细研究了产吲哚金黄杆菌产生的新型金属-β-内酰胺酶[166]。

人金黄杆菌代表之前称为CDC Ⅱe群的部分菌株[241]。大多数菌株菌落外观很黏稠，不产生色素，但随着培养时间的延长菌落可呈浅橙红色，培养数天后仍极少显黄色。与人型金黄杆菌相比较，人金黄杆菌不水解七叶苷，不分解乙二醇产酸。此外，许多人金黄杆菌对去铁胺敏感。大多数用于描述该菌种特征的临床菌株分离自伤口和血培养[241]。人型金黄杆菌包括之前归入CDC Ⅱc群的菌株及CDC Ⅱh群的大多数菌株[242]。人型金黄杆菌不产黄色素，但是有些菌落可呈浅黄色，菌落通常为黏液状。人型金黄杆菌与黏金黄杆菌的鉴别要点是：人型金黄杆菌不产屈挠菌素型色素，不分解阿拉伯糖产酸。有些不产屈挠菌素型色素的产吲哚金黄杆菌与人型金黄杆菌类似，但是人型金黄杆菌无β溶血性且能分解乙二醇产酸。人型金黄杆菌多数菌株分离于血液，其他也可分离于透析液、脓汁、眼分泌物、眶下引流液和主动脉瓣，但其临床意义仍有待确定[242]。

特里维斯金黄杆菌（*Chryseobacterium treverense*）包括之前称为CDC Ⅱe群的部分菌株[243]。虽然有文献描述特里维斯金黄杆菌吲哚阴性，但应使用GNF推荐的方法检测菌株产吲哚情况（见第35章）。特里维斯金黄杆菌与人金黄杆菌、人型金黄杆菌表型相似，但是特里维斯金黄杆菌不水解明胶（或水解明胶能力较弱），且不分解醋酸盐产碱。

4. 脑膜脓毒伊丽莎白金菌、按蚊伊丽莎白金菌和和平空间站伊丽莎白金菌（*Elizabethkingia miricola*） 脑膜脓毒伊丽莎白金菌以前称为脑膜脓毒金黄杆菌（*Chryseobacterium meningosepticum*）[244]，其菌落光滑而大，培养2～3天后，不产生色素或仅能产生浅黄色或浅橙红色色素。生化反应特征是分解甘露醇产酸，具有β-半乳糖苷酶活性，水解明胶和七叶苷。伊丽莎白金菌属和金黄杆菌属细菌可以通过16S rRNA基因序列分析进行鉴别[241,244]。

据报道，脑膜脓毒伊丽莎白金菌与（新生儿）脑膜炎有关[245]，可导致医院内感染暴发[246-247]，

也可导致不同类型的感染（如成人肺炎、脓毒症[199,245]及透析机构内感染[248]）。和平空间站伊丽莎白金菌所致的临床病例（脓毒症）报道仅为 1 次[249]。

2011 年，按蚊伊丽莎白金菌出现报道后[250]，多数报道显示该菌是真正的新兴病原体，尤其对于免疫力低下的患者。2013 年报道，按蚊伊丽莎白金菌引起首例脑膜炎病例[251]。2015 年报道，按蚊伊丽莎白金菌由一位母亲传播给婴儿，随后引起高病死率的菌血症[252]。同年，文献报道按蚊伊丽莎白金菌引起暴发，并对一些菌株的完整基因组进行了测序[253]。一项全球的流行病学研究显示，按蚊伊丽莎白金菌非洲分离株不同的亚型间具有高度遗传相关性，这与该菌株在医院环境中持续存在关系密切[254]。2 例患有多器官功能障碍综合征和下呼吸道感染的不同患者分离出按蚊伊丽莎白金菌[255]，Janda 和 Lopez 得出结论，自 2011 年出现按蚊伊丽莎白金菌（分离于蚊子的中肠）分类学描述 5 年多时间里，按蚊伊丽莎白金菌已成为成人和儿童脓毒症及新生儿脑膜炎病例的重要新兴病原体[256]。该菌至少引起 3 次中至大规模的疾病暴发，其中最大的 2 次发生在 2015－2016 年的美国。一些研究表明，按蚊伊丽莎白金菌（而不是脑膜脓毒伊丽莎白金菌）是该菌属的主要人类病原体，但是按蚊伊丽莎白金菌鉴定困难，其流行病学、传播方式和致病因素也是知之甚少[256]。

5. 短稳杆菌　短稳杆菌[117]菌落外观呈黄色，但是不产生屈挠菌素型色素。短稳杆菌与产吲哚金黄杆菌、黏金黄杆菌、其他 CDC Ⅱb 群菌株及人型金黄杆菌的鉴别要点是：短稳杆菌不水解七叶苷。短稳杆菌能够在麦康凯琼脂上生长和具有较强的明胶酶活性，这有助于其与人金黄杆菌相鉴别。短稳杆菌极少分离自临床样本中[257-258]。

6. 水谷鞘氨醇杆菌　水谷鞘氨醇杆菌之前称为水氏黄杆菌（*Flavobacterium mizutaii*）[206]，最初称为水氏鞘氨醇杆菌（*Sphingobacterum mizutae*）[259]，是鞘氨醇杆菌属中唯一吲哚阳性的菌种[204]。与鞘氨醇杆菌属的其他菌种类似，水谷鞘氨醇杆菌可以分解多种糖类产酸，包括木糖，此菌种与鞘氨醇杆菌属其他菌种相鉴别的要点是：水谷鞘氨醇杆菌产生吲哚，不能在麦康凯琼脂上生长，通常缺乏脲酶活性[46]。

水谷鞘氨醇杆菌与金黄杆菌属和稳杆菌属细菌的鉴别要点是：水谷鞘氨醇杆菌不水解明胶，不产生屈挠菌素型色素，分解木糖产酸，但是不分解乙二醇的特性可将其与其他吲哚阳性的菌种相鉴别。水谷鞘氨醇杆菌的表型特征和金黄杆菌属 CDC Ⅱi 群细菌相似。此外，16S rRNA 基因测序证实大多数 CDC Ⅱi 群菌株确实为水谷鞘氨醇杆菌[204]。

水谷鞘氨醇杆菌一直被认为是吲哚阴性的菌种[206]，但是医生对手中的所有菌株（包括模式菌株）采用 GNF 推荐方法（见第 35 章）进行检测后发现，水谷鞘氨醇杆菌产吲哚能力与金黄杆菌属菌株一样。水谷鞘氨醇杆菌可分离于血液、脑脊液和伤口标本[46]。

7. 法氏沃氏菌　法氏沃氏菌与短稳杆菌密切相关，两者区别在于脲酶活性不同。法氏沃氏菌有 2 个基因型变种[260]：基因型变种 1 水解七叶苷，β-半乳糖苷酶阴性，而基因型变种 2 中，90%的菌株七叶苷阴性，63%的菌株 β-半乳糖苷酶阳性。

法氏沃氏菌曾被认为是不属于稳杆菌属的一个独立的菌属，这种说法是基于法氏沃氏菌 16S rRNA 序列和 EMBL 中一个低质量短稳杆菌序列的比对（未发表的数据）。而高质量的短稳杆菌模式菌株 rRNA 的基因序列结果显示，法氏沃氏菌可能要更名为法氏稳杆菌（*Empedobacter falsenii*）。

法氏沃氏菌较短稳杆菌更常见于临床样本中[260-262]，其临床意义仍有待确定。

8. 有毒威克斯菌　有毒威克斯菌菌落外观呈黏液状，黏附在琼脂上，类似动物溃疡伯杰菌的黏稠菌落。培养 24 h 后菌落无色，培养 2～3 天后菌落呈黄褐色或棕色。有毒威克斯菌菌体的形态学特征可以参照动物溃疡伯杰菌的描述。有毒威克斯菌与动物溃疡伯杰菌的鉴别要点是：有毒威克斯菌脲酶阴性，对多黏菌素 B 和黏菌素敏感；而动物溃疡伯杰菌脲酶强阳性，对多黏菌素 B 和黏菌素耐药。有毒威克斯菌包括以前的 CDC Ⅱf 群菌株[224]。有毒威克斯菌主要分离于尿和阴道标本[224]，可引起术后颅内感染、致命性败血症和腹膜炎[263-265]。相比较而言，动物溃疡伯杰菌更多分离于动物咬伤的伤口[224]。

选择对金黄杆菌属感染有效的抗菌药物治疗方案是很困难的[247]。金黄杆菌属和脑膜脓毒伊

丽莎白金菌对多种常用的治疗革兰阴性菌感染的抗菌药物(如氨基糖苷类、β-内酰胺类抗生素、四环素和氯霉素)天然耐药,而对治疗革兰阳性菌感染的抗菌药物(利福平、克林霉素、红霉素、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑和万古霉素)通常敏感[121-122,199]。尽管早期的研究者推荐应用万古霉素治疗脑膜脓毒伊丽莎白金菌引起的严重感染,但后续的研究表明米诺环素、利福平、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑和喹诺酮类药物在体外有更好的活性[122,246]。在喹诺酮类药物中,左氧氟沙星的活性优于环丙沙星和氧氟沙星[122]。据报道,产吲哚金黄杆菌对头孢噻吩、头孢噻肟、头孢曲松、氨曲南、氨基糖苷类、红霉素、克林霉素、万古霉素和替考拉宁均耐药,而对哌拉西林、头孢哌酮、头孢他啶、亚胺培南、喹诺酮类、米诺环素和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑的敏感性因分离株而异,因此需要对各分离株进行药敏试验[122]。一些研究报道,给予喹诺酮类药物、米诺环素、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑或者利福平治疗局部感染可以改善脑膜脓毒伊丽莎白金菌感染患者的临床转归。由于 CLSI 尚未制定金黄杆菌属细菌的耐药和敏感的 MIC 折点,而且纸片扩散试验对于预测金黄杆菌属细菌的药敏结果不可靠[266],故选择合适的抗菌药物进行治疗变得更加复杂。E 试验法是标准琼脂稀释法的可能的替代方法,可用于测试头孢噻肟、头孢他啶、阿米卡星、米诺环素、氧氟沙星和环丙沙星,但不适用于检测哌拉西林[267]。对具有临床意义的菌株进行确切的治疗应参照 MIC 法所测定的个体化药敏结果来指导实施。

(五)产粉色素的 GNF

需要注意的是,人金黄杆菌和脑膜脓毒伊丽莎白金菌在一些培养基上培养数天后会呈现浅橙红色,但这不能和此处讨论的明显产粉色素的分类群相混淆(表 46-6)。

表 46-6 产粉色素的 GNF[a]

特征	浅井菌属(2)	固氮螺菌属(3)	甲基杆菌属(4)	颈玫瑰单胞菌(2)	吉氏玫瑰单胞菌吉氏亚种和吉氏玫瑰单胞菌玫瑰亚种(5)	黏液玫瑰单胞菌(9)	玫瑰单胞菌基因种 4(1)	玫瑰单胞菌基因种 5(4)
氧化酶	0	100	0	100	100,w	11,w	100	100,w
利用以下物质产酸								
葡萄糖	100	0	(25)	0	(20)	100	(100)	0
果糖	100	(100),w	0	50	60/(40)	100	100	(100)
甘露醇	100	0	0	0	(80)	100	0	0
木糖	100	100	100	(100)	0	0	0	0
阿拉伯糖	100	100	100	100	100	100	0	0
乙二醇	100	100	100	100	100	100	0	0
脲酶活性	0	100	100	100	100	100	100	100
硝酸盐还原酶	0	100	0	0	0	0	100	0
水解七叶苷	0	100	0	0	0	0	0	0
胰蛋白酶	100	0	100	0	0	0	0	0
吡咯烷酮氨肽酶	0	100	0	0	100	100	0	0
β-半乳糖苷酶(ONPG[b])	0	100	0	0	0	0	0	0
对以下药物敏感								
黏菌素	0	0	0	0	40	45	0	25
去铁胺	0	0	0	0	0	0	100	0

注:[a] 菌名后括号中的数字代表测试的菌株数。数值是百分数;括号中的数值代表延迟反应阳性比例。w. 弱阳性反应。[b]ONPG. 邻硝基苯-β-D-半乳糖苷

1. 浅井菌属 浅井菌属隶属于 α 变形菌纲，醋酸杆菌科。据报道，浅井菌属细菌在自然界中存在于树兰的花朵、石墨和发酵的糯米中，来源于热带气候地区，特别是印度尼西亚和泰国。

浅井菌属细菌在 SBA 上生长相对缓慢，菌落呈浅粉色。与甲基杆菌属细菌不同的是，其菌落在紫外线照射下不变黑。浅井菌属细菌是菌体偏小或中等大小的革兰阴性杆菌，通常可以通过单端或双端或侧鞭毛运动。本属细菌氧化酶阴性，分解糖的能力强；如在低蛋白胨酚红琼脂上常 1 h 内即可迅速分解葡萄糖、甘露醇、木糖和左旋阿拉伯糖产酸，也可以分解乙二醇产酸。此外，浅井菌属细菌除了具有苯甲基精氨酸氨肽酶（胰蛋白酶）活性外，其他生化反应相当不活泼。浅井菌属细菌可通过菌体形态学、较强的分解糖能力及分解甘露醇产酸特性与甲基杆菌属细菌相鉴别。

文献报道，博果尔浅井菌（*Asaia bogorensis*）是腹膜透析患者腹膜炎的常见病因[268]，也是静脉注射吸毒后菌血症的常见病因[269]。兰纳浅井菌（*Asaia lannensis*）已确定为患有先天性扩张型心肌病的儿科患者发生医院感染的病因[270]，也是一例患者滥用注射发生菌血症的病因[271]。

有文献报道，在纸片扩散试验中，浅井菌属细菌对头孢他啶、美罗培南、亚胺培南、甲氧苄啶、阿米卡星、万古霉素、氨曲南、青霉素及氨苄西林耐药[272]。Snyder 等[268]报道，采用纸片扩散试验，博果尔浅井菌对氨基糖苷类（阿米卡星、妥布霉素及庆大霉素）敏感，对头孢他啶和美罗培南耐药。

2. 固氮螺菌属（*Azospirillum*） 以前的玫瑰单胞菌基因种 3［费氏玫瑰单胞菌（*Roseomonas fauriae*）］和基因种 6 已划归入固氮螺菌属（隶属于 α 变形菌纲，红螺菌科），这是一种不同于红螺菌生活规律的固氮植物的共生体菌属[273]，该菌属的一些菌株偶尔从临床样本中分离[274]。

固氮螺菌属细菌的菌落外观呈浅粉色，这与玫瑰单胞菌属细菌相似。较玫瑰单胞菌属，菌体更多为杆状，并且可通过单端或双端鞭毛运动。此菌和玫瑰单胞菌属类似，属氧化酶阳性，脲酶强阳性。固氮螺菌属细菌具有 β-半乳糖苷酶活性并水解七叶苷，这些特性可将其和其他产粉色素菌种相鉴别。

3. 甲基杆菌属 甲基杆菌属隶属于 α 变形菌纲，甲基杆菌科，目前包括 50 多个菌种。甲基杆菌属大部分细菌分离自植物，偶有发现于医院环境中。嗜中温甲基杆菌（*Methylobacterium mesophilicum*）［之前称为嗜中温假单胞菌（*Pseudomonas mesophilica*）、扭脱假单胞菌（*Pseudomonas extorquens*）和扭脱弧菌（*Vibrio extorquens*）］、扭脱甲基杆菌（*Methylobacterium extorquens*）和扎特曼甲基杆菌（*Methylobacterium zatmanii*）是分离自无菌体液标本（血液、脑脊液、骨髓、滑膜、腹水和腹膜液）最常见的 3 个菌种[275]。

甲基杆菌属细菌的菌落小，干燥，呈珊瑚红色，在紫外光的照射下，菌落可因吸收紫外光而呈黑色[274]。在普通培养基（如 TSA）上生长差；在 SBA 培养基、改良的 Thayer-Martin 培养基、缓冲活性炭酵母抽提物和 Middlebrook 7H11 琼脂平皿上培养 4～5 天后，可生长出直径 1 mm 的菌落；在沙保罗琼脂上生长最好；在麦康凯琼脂上通常不生长。最适生长温度为 25～30℃。该属细菌可以利用甲醇作为唯一的碳源和能量来源，然而传代培养的菌株可能会失去这种特性。菌体呈多形性、中空的杆状，着色差，也不易脱色（图 46-4）。细菌依靠单端鞭毛运动，但是难以证实。在属的描述中[276]，甲基杆菌属细菌氧化酶阳性，但是笔者应用二甲基对苯二胺测试的一些菌株氧化酶全部是阴性。甲基杆菌属细菌分解糖的能力比浅井菌属弱，不分解甘露醇产酸，而分解葡萄糖产酸存在菌株差异，分解阿拉伯糖、木糖和乙二醇产酸，水解尿素和淀粉。



图 46-4 甲基杆菌属细菌革兰染色，显示多形性革兰阴性杆菌，菌体中有空泡，见彩插

总的来说，甲基杆菌属细菌作为条件致病菌可引起免疫力低下患者出现轻度的临床症状，但据报道，本属细菌会导致免疫力低下患者发生脓毒症、持续不卧床腹膜透析相关性腹膜炎、皮肤溃疡、滑膜炎和其他感染[277-281]。甲基杆菌属细菌能够形成生物被膜，耐受高温、干燥和消毒剂，这有助于其在医院环境中（如内镜）的定植[275]。自来水可能是该菌在医院环境中传播的一种媒介，前文已有文献描述供水系统中甲基杆菌的监测方法[3]。

治疗甲基杆菌的抗菌药物包括氨基糖苷类药物和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑，而β-内酰胺类药物的活性因菌种而异[282]。应用琼脂或者肉汤稀释法，30℃培养48 h进行药敏试验，效果最佳[30]。

4. 玫瑰单胞菌属 玫瑰单胞菌属隶属于α变形菌纲，醋酸杆菌科，早先的描述包括3个已命名的菌种[吉氏玫瑰单胞菌（*Roseomonas gilardii*）（基因种1）、颈玫瑰单胞菌（*Roseomonas cervicalis*）（基因种2）及费氏玫瑰单胞菌（*Roseomonas fauriae*）（基因种3）]，还有3个未命名的菌种（玫瑰单胞菌基因种4、5及6）[274]。目前，玫瑰单胞菌基因种3和6已经被归入固氮螺菌属。最近报道，本属细菌包括28个菌种；模式菌种为吉氏玫瑰单胞菌，包括吉氏玫瑰单胞菌玫瑰亚种（*Roseomonas gilardii* subsp. *rosea*）和吉氏玫瑰单胞菌吉氏亚种（*Roseomonas gilardii* subsp. *gilardii*）[273]。

玫瑰单胞菌属以下菌种可分离于临床标本：吉氏玫瑰单胞菌吉氏亚种、吉氏玫瑰单胞菌玫瑰亚种、黏液玫瑰单胞菌、颈玫瑰单胞菌、玫瑰单胞菌基因种4及玫瑰单胞菌基因种5。

玫瑰单胞菌属细菌的菌落呈黏液流动状，较浅井菌属和甲基杆菌属的菌落大，颜色呈浅粉色或珊瑚红色。菌体无空泡，为球形、圆胖的杆菌，多数成对或短链状排列（图46-5），常通过单端或双端鞭毛运动，但是动力常难以证实。玫瑰单胞菌基因种5无动力，37℃时在普通培养基如SBA上可生长，大多数能在麦康凯琼脂上生长，但在沙保罗琼脂上生长最好。氧化酶活性因菌种类型而异，且通常反应较弱。糖分解能力也因菌种而异，所有玫瑰单胞菌属细菌可强力水解尿素，不水解七叶苷、胰蛋白酶和β-半乳糖苷酶阴性。不同菌种的表型鉴别可根据氧化酶活性、分解糖类产酸、吡咯烷酮氨肽酶活性和硝酸盐还原酶活性进行区分。

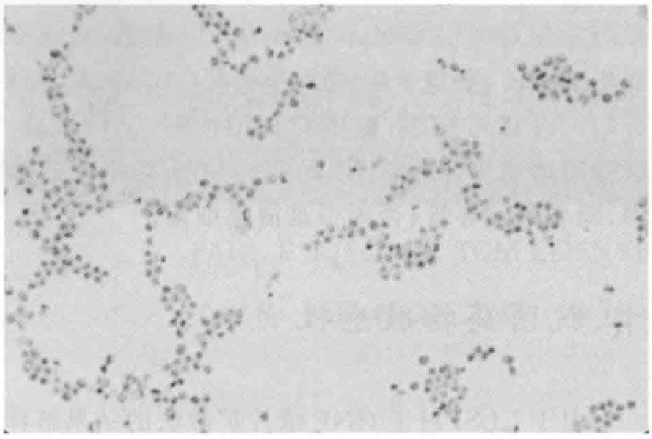


图46-5 玫瑰单胞菌属细菌革兰染色，显示为革兰阴性球形细菌，见彩插

黏液玫瑰单胞菌可以快速分解阿拉伯糖、甘露醇和果糖产酸，在1～3天内可分解葡萄糖产酸，氧化酶阴性，吡咯烷酮氨肽酶阳性。吉氏玫瑰单胞菌吉氏亚种和吉氏玫瑰单胞菌玫瑰亚种氧化酶弱阳性，吡咯烷酮氨肽酶阳性，2个亚种不能通过当前的表型试验来鉴别。吉氏玫瑰单胞菌吉氏亚种和吉氏玫瑰单胞菌玫瑰亚种糖分解能力不如黏液玫瑰单胞菌，可分解阿拉伯糖和果糖产酸，但分解甘露醇产酸不定且缓慢，几乎不分解葡萄糖。颈玫瑰单胞菌氧化酶强阳性，但是吡咯烷酮氨肽酶阴性，2天内可分解阿拉伯糖和果糖产酸，3天或4天内可以分解木糖。检测的基因种4的唯一单株菌氧化酶阳性，吡咯烷酮氨肽酶阴性，糖分解能力有限，只能分解葡萄糖和果糖产酸，是唯一能还原硝酸盐的菌种。基因种5氧化酶弱阳性，吡咯烷酮氨肽酶阴性，是糖分解能力最弱的菌种，仅能迟缓分解果糖产酸。除了基因种4和基因种5，所有的菌种都可以分解乙二醇产酸。

玫瑰单胞菌属细菌不常见于人类标本，但仍为最常见的产粉色素的GNF。临床菌株可分离于血液、伤口、渗出液、脓肿、泌尿生殖道、持续不卧床腹膜透析液及骨髓[283-287]。一篇综述汇总了35例玫瑰单胞菌属细菌引起的机会性感染[199]。多项病例报道显示，约有60%的菌株分离于血液，20%的菌株分离于伤口、渗出液和脓肿，10%的菌株分离于泌尿生殖道[283,285]。

Dé等[283]总结了3篇已发表的报道，共计80株玫瑰单胞菌属细菌的药敏数据。所有的菌株对

阿米卡星(100%)敏感;通常对亚胺培南(99%)、环丙沙星(90%)和替卡西林(83%)敏感;对头孢曲松(38%)、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(30%)、氨苄西林(13%)相对敏感;极少对头孢他啶(5%)敏感。所有的菌株对头孢吡肟耐药。在导管相关感染中,除非移除导管,否则很难清除细菌。

十、抗菌药物敏感性

由于CLSI对于GNF纸片扩散法的结果解释指南仅限于假单胞菌属、洋葱伯克霍尔德菌、嗜麦芽窄食单胞菌和不动杆菌属,因此,实验室决定是否进行药敏试验变得复杂。除不动杆菌属外,本章介绍的其他菌种都不适用。此外,不动杆菌属纸片扩散法结果与常规MIC法结果并不相关。总之,对于本章讨论的菌种,实验室应尽量避免进行药敏试验。当临床科室需要报告药敏结果时,建议应用过夜的MIC法,例如,在MH琼脂上进行Etest(bioMérieux)试验[267]。

十一、结果的评价、解释和报告

虽然有时某些GNF可直接致病,如类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*)、脑膜脓毒伊丽莎白金菌和铜绿假单胞菌,但总体上这些菌致病力不强,并常出现于混合感染中,这造成很难确定何时该对培养物进行鉴定和药敏试验。新生儿脑膜炎中分离出的脑膜脓毒伊丽莎白金菌,眼部感染分离出的腔隙莫拉菌和呼吸道感染分离出的卡他莫拉菌,这些菌均应报道为有临床意义的病原菌。临床标本直接革兰染色可能价值有限,这是因为这些细菌经常出现于混合感染中,其临床意义需要结合下面要讨论的内容。临床标本中GNF的临床意义必须要考虑患者的临床状态及培养送检标本的来源。总的来说,从正常无菌部位纯培养分离的GNF必须进行鉴定和药敏试验,而有菌部位标本中GNF呈优势生长,如无肺炎的临床症状或体征的患者的气管内培养物,则不必进一步处理。GNF的鉴定对于证明医院环境或医疗器械相关的医院内感染暴发也很重要。由于多数GNF是多重耐药菌,故使用抗菌药物治疗的患者常可定植GNF。混合培养物中分离出GNF通常可以用描述性鉴定进行结果报道,如报道为"铜绿假单胞菌和2种未进一步鉴定的GNF生长。"

参考文献请扫二维码查阅

第47章　鲍特菌属及相关菌属

PAUL E. KILGORE TOM COENYE

（王倩　译；陈茶、王辉　审校）

一、分类

鲍特菌属（*Bordetella*）、无色杆菌属（*Achromobacter*）、产碱杆菌属（*Alcaligenes*）、凯斯特菌属（*Kerstersia*）、颇陌菌属（*Advenella*）及类产碱杆菌属（*Paenalcaligenes*）隶属于产碱杆菌科（β-变形杆菌纲，伯克霍尔德菌目）[1]。

鲍特菌属包括15个菌种：鸟鲍特菌（*Bordetella avium*）、支气管鲍特菌（*B. bronchialis*）、支气管脓毒鲍特菌（*B. bronchiseptica*）、呼吸鲍特菌（*B. flabilis*）、欣氏鲍特菌（*B. hinzii*）、霍姆鲍特菌（*B. holmesii*）、壁鲍特菌（*B. muralis*）、副百日咳鲍特菌（*B. parapertussis*）、百日咳鲍特菌（*B. pertussis*）（模式菌种）、派替鲍特菌（*B. petrii*）、假欣氏鲍特菌（*B. pseudohinzii*）、生痰鲍特菌（*B. sputigena*）、伤口鲍特菌（*B. trematum*）、陵墓鲍特菌（*B. tumbae*）及居陵墓鲍特菌（*B. tumulicola*）[2-6]。其他推定的种，如"亚洲监网鲍特菌"（*B. ansorpii*）和其他一些类似于伤口鲍特菌的菌株，文献有相应描述，但其命名尚未得到权威部门认可。百日咳鲍特菌、副百日咳鲍特菌和支气管脓毒鲍特菌在遗传学上可被视为同一种，但三者在化学分类、宿主范围和致病机制方面[2,7]的差异支持作为单独的种的地位。基因组测序分析显示副百日咳鲍特菌和百日咳鲍特菌是类支气管脓毒鲍特菌（*B. bronchiseptica*-like）祖先独立衍生而来的[7]。无色杆菌属的分类易与产碱杆菌属混淆，产碱杆菌属目前分类仅包括水生产碱杆菌（*Alcaligenes aquatilis*）、粪产碱杆菌（*A. faecalis*）及巴基斯坦产碱杆菌（*A. pakistanensis*），而无色杆菌属包含19个菌种，即致病无色杆菌（*Achromobacter aegrifaciens*）、敏捷无色杆菌（*A. agilis*）、芦荟无色杆菌（*A. aloeverae*）、灵气无色杆菌（*A. animicus*）、焦虑无色杆菌（*A. anxifer*）、德雷无色杆菌（*A. deleyi*）、脱硝化无色杆菌（*A. denitrificans*）、疼痛无色杆菌（*A. dolens*）、罕见无色杆菌（*A. insolitus*）、不适无色杆菌（*A. insuavis*）、克氏无色杆菌（*A. kerstersii*）、马德普拉塔无色杆菌（*A. marplatensis*）、居黏膜无色杆菌（*A. mucicolens*）、鼠疫无色杆菌（*A. pestifer*）、皮氏无色杆菌（*A. piechaudii*）、肺无色杆菌（*A. pulmonis*）、鲁兰无色杆菌（*A. ruhlandii*）、少见无色杆菌（*A. spanius*）及木糖氧化无色杆菌（*A. xylosoxidans*）（模式菌种）[3,6,8-13]。此外，无色杆菌属包含数个尚未命名的基因群[14]。凯斯特菌属是对一系列表型特征与粪产碱杆菌相类似的菌种进行分类而提出的菌属，该菌属包括腿伤凯斯特菌（*Kerstersia gyiorum*）和模仿凯斯特菌（*K. similis*）2个种[8]。同样，颇陌菌属也是由许多与产碱杆菌类似的菌株建立而来，这些菌株可能是食烷烃颇陌菌（*Advenella alkanexedens*）、猪粪颇陌菌（*A. faeciporci*）、斋戒颇陌菌（*A. incenata*），或是未命名基因种中的某一种[15]，也可能是以前被称为四硫代菌属（*Tetrathiobacter*）的菌种[16]。最后，类产碱杆菌属包括3个菌种，即水虻类产碱杆菌（*Paenalcaligenes hermetiae*）、人型类产碱杆菌（*P. hominis*）及水原类产碱杆菌（*P. suwonensis*）[17]。

二、属的描述

（一）鲍特菌属

鲍特菌属细菌是革兰阴性无芽胞的小球杆菌（1～2 μm）[18]。鲍特菌属中主要菌种基因组大小如下：百日咳鲍特菌为4.086 Mbp，副百日咳鲍特菌为4.774 Mbp，支气管脓毒鲍特菌为5.338 Mbp，派替鲍特菌为5.287 Mbp，而鸟鲍特菌为

3.732 Mbp,霍姆鲍特菌约为 3.8 Mbp,其中百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌相对属内其他一些菌种的基因组要小。基因组插入序列主要见于百日咳鲍特菌(如 IS481 和 IS1002)、副百日咳鲍特菌(如 IS1001)和霍姆鲍特菌(如 IS481 和 IS1001-like),较少见于支气管脓毒鲍特菌[7,19-20]。不同菌种之间的基因组比较显示,所有菌种只有约 50%的基因是保守的,并且,基因的获得或缺失、点突变和水平基因转移等多种机制,都可能在菌种的进化中发挥重要作用[21]。鲍特菌毒力基因变化的分析表明,鲍特菌的进化枝、菌种和菌株可发生菌体 O 抗原、蛋白质分泌系统和细菌毒素的特异变化,这些变化可能导致百日咳疫苗成分编码基因发生改变[22]。

鲍特菌属细菌触酶阳性,氧化氨基酸,不发酵糖类。部分菌种有周身鞭毛,可运动。该菌属需氧条件下可以在普通人工培养基上生长(派替鲍特菌除外,见下文描述)。然而,由于百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌对很多微生物培养基中的毒性物质和代谢产物较为敏感,因此分离培养这 2 种菌时,需要特殊的运送条件、特殊的培养基,并需要延长培养时间。其他菌种对毒性物质敏感性较低,按常规的微生物分离操作流程即可分离。

派替鲍特菌是鲍特菌属中生命力最强的菌种,在有氧和无氧环境下都可以生存,其最初发现时,被当成一种营自生生活的环境菌[20]。其他鲍特菌属的菌种都仅能生存于温血动物和人类中。鸟鲍特菌是家禽的病原菌,仅从人类标本中分离出 1 次。支气管脓毒鲍特菌可以引起多种动物的呼吸道感染,偶尔也会感染人类。霍姆鲍特菌最近确认为大部分免疫抑制和免疫缺陷患者的相关病原体,可能会引起一系列多器官系统的全身性疾病[23-24]。"亚洲监网鲍特菌"、欣氏鲍特菌、派替鲍特菌和伤口鲍特菌很少引起人类感染,主要在免疫功能低下患者中出现感染症状。副百日咳鲍特菌发现于绵羊和人类,而百日咳鲍特菌被认为是严格的人类病原体(表 47-1)。

表 47-1 鲍特菌属各菌种

菌种	宿主	疾病
鸟鲍特菌	家禽	呼吸系统疾病
	人类	呼吸系统疾病
支气管鲍特菌	人类	呼吸系统疾病(囊性纤维化患者)
支气管脓毒鲍特菌	动物	呼吸系统疾病
	人类	呼吸系统疾病,全身性感染(免疫功能低下的宿主)
呼吸鲍特菌	人类	呼吸系统疾病(囊性纤维化患者)
欣氏鲍特菌	家禽	呼吸系统疾病
	人类	胆管炎,关节炎
霍姆鲍特菌	人类	呼吸系统疾病,全身性感染(免疫功能低下的宿主)
壁鲍特菌	环境	
副百日咳鲍特菌	人类	副百日咳(百日咳样疾病)
	绵羊	呼吸系统疾病
百日咳鲍特菌	人类	百日咳
派替鲍特菌	环境	
	人类	骨髓炎,乳突炎
假欣氏鲍特菌	鼠	气道炎症
生痰鲍特菌	人类	呼吸系统疾病(囊性纤维化患者)
伤口鲍特菌	人类	伤口感染,耳炎
陵墓鲍特菌	环境	
居陵墓鲍特菌	环境	
"亚洲监网鲍特菌"	人类	表皮囊肿,全身性感染(免疫功能低下的宿主)

鲍特菌属细菌可以表达多种毒力因子,这些毒力因子由一套很复杂的毒力表达系统调控,可针对不同的环境条件(*BvgAS*)做出应答[2,25],可以在模式 X(呼吸道感染)、模式 I(媒介,可能与传播有关)和模式 C(饥饿)之间转换。鲍特菌属细菌的毒力因子分为黏附素、自动转运子(如丝状血凝素、菌毛、百日咳杆菌黏附素)及毒素[如百日咳毒素(pertussis toxin,PT)、腺苷酸环化酶溶血素和脂多糖][2]。仅百日咳鲍特菌产生由 *ptx* 基因编码的 PT,副百日咳鲍特菌和支气管脓毒鲍特菌虽然携带 *ptx* 基因,但正常情况下缺失启动子[2]。PT 具有二磷酸腺苷核糖基转移酶活性,使 G(i)蛋白核糖基化[3],从而抑制趋化作用、氧化反应及中性粒细胞和巨噬细胞的整体活性。丝状血凝素是一种表面相关的大分子分泌蛋白(220 kDa),可以介导鲍特菌对上呼吸道纤毛上皮的黏附作用。百日咳鲍特菌、副百日咳鲍特菌和支气管脓毒鲍特菌均可以表达丝状血凝素[2]。2 型菌毛(FIM)和 3 型菌毛是菌体定植在呼吸道黏膜上的重要因子,百日咳鲍特菌的菌体表面可能表达 FIM2 或 FIM3,或两者兼有。腺苷酸环化酶溶血素是一种具有酶活性的溶血素[26]。百日咳鲍特菌还可以生成缺乏重复 O-抗原链的脂多糖。鲍特菌的黏附

素是一种分子量为68～70 kDa的表面蛋白，体外可介导真核细胞结合[2]，这种蛋白与细胞黏附有关，有极高的免疫原性[27]。近年来，在很多国家，不表达黏附素的鲍特菌株分离率增加，且黏附素阳性菌株和阴性菌株所引起的临床表现相似[28-30]。百日咳鲍特菌、副百日咳鲍特菌和支气管脓毒鲍特菌也具有共同的毒力基因，包括编码Ⅲ型分泌系统和鲍特菌分泌的蛋白调节子(BspR)，后者是跨菌种的高度保守的蛋白[31]。

(二)无色杆菌属

无色杆菌属细菌是革兰阴性无芽胞的小杆菌。大多数菌种有动力，但个别菌种如肺无色杆菌动力弱或缺失，而不适无色杆菌动力因菌株而异。尽管某些种的菌株可在厌氧环境下利用硝酸盐作为电子受体生长[10]，但无色杆菌属细菌仍属于严格需氧的非发酵菌。无色杆菌属氧化酶和触酶阳性，而脱氧核糖核酸酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶和明胶酶均为阴性[9-12]，脲酶活性仅报道于芦荟无色杆菌。细菌在普通培养基上生长良好，在营养琼脂上菌落平坦或略有凸起，边缘光滑，颜色白色至浅棕色不一[9]，实验室条件下生长温度为30～37℃，NaCl浓度范围为0～1.5%[9,10,32]。某些无色杆菌菌种具有Q-8泛醌系统[1]，主要的脂肪酸是$C_{16:0}$、$C_{17:0\ cyclo}$和$C_{18:0\ \omega7c}$[9-11]。虽然目前，无色杆菌属细菌的自然栖息地尚不明确，但是土壤和水被认为是感染的主要来源[1]。

(三)产碱杆菌属、凯斯特菌属、颇陌菌属和类产碱杆菌属

参考分类学文献，目前产碱杆菌属仅包括粪产碱杆菌、水生产碱杆菌和巴基斯坦产碱杆菌(*Alcaligenes pakistanensis*)。粪产碱杆菌包括3个亚种[粪产碱杆菌粪亚种(*Alcaligenes faecalis* subsp. *faecalis*)、粪产碱杆菌副粪亚种(*Alcaligenes faecalis* subsp. *parafaecalis*)及粪产碱杆菌酚亚种(*Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus*)]。粪产碱杆菌副粪亚种、粪产碱杆菌酚亚种、水生产碱杆菌和巴基斯坦产碱杆菌都仅有环境分离株。某些粪产碱杆菌菌株可以产生特征性的水果香味和(或)在血平板上产生绿色的变色现象，这些菌株以前称为“芳香产碱杆菌”(*Alcaligenes odorans*)。产碱杆菌属细菌是专性需氧的革兰阴性杆菌或球杆菌，氧化酶和触酶阳性[1]，菌体可以通过1～12根周身鞭毛运动，最适生长温度为20～37℃，在普通培养基上生长良好，在营养琼脂平板上通常不产生色素。产碱杆菌属细菌主要的脂肪酸是$C_{16:0}$和$C_{17:0\ cyclo}$。

凯斯特菌属和颇陌菌属细菌是革兰阴性短小(1～2 μm)的球杆菌，常单个、成对或短链状排列。动力因菌株而异。它们在普通培养基上生长良好，在营养琼脂上，菌落扁平或微凸，边缘光滑，白色至浅棕色。两菌属细菌均为专性需氧非发酵菌。目前研究发现的所有菌株触酶阳性，且无β-半乳糖苷酶活性[8,15]。凯斯特菌属细菌生长温度为28～42℃，NaCl浓度高达4.5%也可生长，主要的脂肪酸是$C_{16:0}$和$C_{17:0\ cyclo}$[8]。颇陌菌属细菌生长温度为30～37℃，NaCl浓度范围为0～3%，主要的脂肪酸是$C_{18:1\ \omega7c}$、$C_{16:0}$和$C_{16:1\ \omega7c}$[15]。

人型类产碱杆菌是革兰阴性小杆菌(1～2 μm)。在营养琼脂上生长良好，适宜生长温度为25～30℃，氧化酶阳性。不能利用糖和糖类化合物。主要的脂肪酸是$C_{16:0}$、重叠的特征脂肪酸3[包含$C_{16:1\ \omega7c}$和(或)异辛烷-$C_{15:0}$2-OH]、$C_{17:0\ cyclo}$和$C_{18:0\ \omega7c}$[17]。

三、流行病学和传播

(一)百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌

百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌通过飞沫传播；百日咳鲍特菌在易感者间的传播率接近90%，感染剂量仅约100 CFU[2]。百日咳鲍特菌的流行呈现季节性变化，在北美的秋季和冬季均暴发疫情，而英国、荷兰，以及塞内加尔在夏季和冬季疫情均呈现流行高峰[33]。细菌黏附于鼻咽部的纤毛细胞，然后定植于上呼吸道。百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌是百日咳的病原菌。副百日咳鲍特菌感染较百日咳鲍特菌引发的临床症状轻，病程较短，很少引起呕吐和哮喘[2,34-37]。据估计，全球范围内5岁以下儿童每年共计约2410万百日咳住院病例和16.07万死亡病例，其中非洲所占比例最高[38]，事实上数据可能还远不止于此[39]。自然感染和接种疫苗获得的免疫力在几年之后就会减弱，因此，即使在广泛接种疫

苗的婴幼儿人群中，百日咳鲍特菌仍可以传播[36,40]。副百日咳鲍特菌引起百日咳样疾病。最近的数据表明，当前的百日咳疫苗可以在婴幼儿体内产生作用于副百日咳鲍特菌的交叉保护性抗体[41]。在接种疫苗的国家中，百日咳高发于新生儿、未接种疫苗的婴儿、年长的学龄儿童、青少年和成人中[35-36,40,42-43]。虽然在疾病暴发时，应用 PCR 方法可从无症状短期携带者标本中检测出鲍特菌的 DNA[2,37]，但是百日咳不会出现持久的病原体携带状态。据估计，在欧洲已接种疫苗的人群中，百日咳的基本再生数(basic reproduction number)约为 5.5[44]，传播途径主要是从青少年和成人向婴儿传播，或者在已接种疫苗的幼童、青少年和成人之间相互传播[2,35]。新生儿和婴儿被该菌感染最大的威胁来自于其父母，哪怕只是偶尔接触也可能非常重要[45]。在许多国家如澳大利亚、巴西、美国和英国，近年来感染病例明显增加，引起疾病暴发的可能因素如下：疫苗覆盖不全、未按期接种、诊断效率提高、流行菌株改变、疫苗接种后保护周期缩短及个体的免疫力存在差异[46]。

(二)鲍特菌属其他菌种、无色杆菌属、产碱杆菌属、凯斯特菌属和颇陌菌属

在鲍特菌属中，通过 PCR 法以 *IS481* 作为靶基因发现的霍姆鲍特菌[5,24]越来越多，该基因显示，霍姆鲍特菌和百日咳鲍特菌及鲍特菌属其他菌种具有同源性(表 47-2 和表 47-3)[47,48]。

表 47-2 实时定量 PCR 检测鲍特菌 DNA 可能的靶位

靶位	存在靶位的细菌	~拷贝数量/基因组	备注
IS481	百日咳鲍特菌	~200	
	霍姆鲍特菌	~10	
	支气管脓毒鲍特菌	<5	<1%的菌株
IS1001	副百日咳鲍特菌	~20	
	支气管脓毒鲍特菌	<5	~50%的菌株
IS1002	百日咳鲍特菌	~10	
	副百日咳鲍特菌	<5	
h *IS1001*	霍姆鲍特菌		
ptxP	百日咳鲍特菌	1	
recA	霍姆鲍特菌	1	

表 47-3 鲍特菌 PCR 可能的结果和建议的解释

靶位结果[a]					报告
IS481	*IS1001*	*IS1002*	*ptxP*	*recA*	
+	−	+	+	−	百日咳鲍特菌
+	−	+	−	−	百日咳鲍特菌
+	−	−	−	−	鲍特菌属
−	+	+	−	−	副百日咳鲍特菌
−	+	−	−	−	鲍特菌属
+	−	−	−	+	霍姆鲍特菌

注：[a] +. 阳性；−. 阴性

有关流行病学和传播的数据仅限于囊性纤维化(cystic fibrosis,CF)患者无色杆菌属细菌的感染。木糖氧化无色杆菌可引起持续性感染，其证据是呼吸道标本中可长时间分离到基因型相同的菌株[49-51]。多篇文献报道[50-53]，很多 CF 患者定植或感染了同样的木糖氧化无色杆菌。

有研究表明，某些菌株在 CF 患者中的传播既存在患者之间的传播，也有从环境中获得感染[51,54]。"丹麦流行菌株"被证实为鲁兰无色杆菌[55]。该菌株在 2 家丹麦囊性纤维化中心曾感染多例患者，且患者间发生了间接接触而导致的交叉感染[56]。

四、临床意义

(一)百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌

经过 7~10 天潜伏期(4~28 天)之后，百日咳最先出现的感染症状是流鼻涕、打喷嚏和非特异性咳嗽(卡他期)。百日咳的临床症状见于未接种疫苗儿童的原发感染，临床表现为气道痉挛、咳嗽、哮喘和呕吐(发作期)[36,57]。新生儿和未预防接种的婴儿往往仅以呼吸暂停为唯一症状[2,40,58]。年长的学龄儿童、青少年和成人的症状则差异很大。成人百日咳往往表现为久治不愈，持续阵发性咳嗽，每次持续咳嗽时间约 6 周。即使没有阵发性咳嗽，持续咳嗽超过 3 周应怀疑百日咳。百咳嗽常伴有窒息和呕吐[35]。美国 CDC 明确规定，百日咳临床病例须出现阵发性咳嗽达 14 天，且伴哮喘或呕吐(http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/survmanual/chpt10-pertussis.html)。婴幼儿发病最为凶险，住院治疗和死亡多见于这个阶段。在年龄更小的婴儿，致死性的病例可能检测不出

来[40,59]。百日咳样症状也可由腺病毒、呼吸道合胞病毒、人类副流感病毒、流感病毒、肺炎支原体及其他的病原体引起[40,60]。

(二)鲍特菌属其他菌种

由于霍姆鲍特菌更常见[5]，故怀疑该菌可能是引起青少年和成人呼吸道症状[47-48]或免疫力低下患者多器官炎症反应的病原菌。全球各地出现霍姆鲍特菌引起的百日咳样疾病的病例报道[24,48,61]，西班牙最近的研究显示，百日咳确诊患者送检样本约9%检测到霍姆鲍特菌阳性[61]。支气管脓毒鲍特菌、派替鲍特菌、鸟鲍特菌、"亚洲监网鲍特菌"和欣氏鲍特菌极少从有呼吸道症状患者的呼吸道标本中分离。在多数情况下，患者常伴有全身性或局部的免疫功能不全。如同其他革兰阴性非发酵菌，这些病原体可引起菌血症、脓毒症和其他一些侵袭性疾病。其他菌种报道较少。伤口鲍特菌分离自从事家禽业的工人，"亚洲监网鲍特菌"为脓毒症的罕见病因。派替鲍特菌和其他环境中的鲍特菌极少分离于临床标本。迄今为止，鸟鲍特菌仅从人类呼吸道标本中分离出1次。

(三)无色杆菌属

无色杆菌属许多菌种都可以从临床标本或医院环境中分离出来。木糖氧化无色杆菌是人类机会致病菌，可以引起各种感染性疾病，如菌血症、脑膜炎、肺炎和腹膜炎[62-63]。木糖氧化无色杆菌可通过污染的消毒剂、透析液、盐溶液和水引起医院感染[64]。皮氏无色杆菌分离于各种临床标本，包括咽拭子、鼻分泌物、伤口、血液及慢性耳损伤分泌物标本[65]。脱硝化无色杆菌(以前称为木糖氧化无色杆菌脱硝化亚种)可分离于各种临床标本，如尿、直肠镜检标本、前列腺液、口腔颊间隙、胸水和眼拭子，但是缺乏关于其临床意义的详细报道。罕见无色杆菌(分离于1例腿部伤口和尿)和少见无色杆菌(分离于血液)可出现于临床标本中，但其临床意义不明[9]。以下这些最近描述的新菌种主要分离于CF患者的痰，包括致病无色杆菌、灵气无色杆菌、焦虑无色杆菌、疼痛无色杆菌、不适无色杆菌、马德普拉塔无色杆菌、居黏膜无色杆菌及肺无色杆菌，这些菌的临床意义尚不明确[10-11]。

无色杆菌属常与囊性纤维化相关。自1985年报道木糖氧化无色杆菌分离于CF患者以来，其在CF患者中的发生率从3%上升至18%[54,66-68]。然而，近期的多位点序列分析和(或)*nrdA*基因测序研究表明，引起CF患者感染的往往是非木糖氧化无色杆菌的其他无色杆菌[11,55,69-70]。例如，在美国341例感染无色杆菌的CF患者中，42%感染了木糖氧化无色杆菌，而1984—2013年回顾性分析显示，前往加拿大CF诊所就诊的无色杆菌培养阳性的患者有50%定植了木糖氧化无色杆菌[71]。还有2项研究关于木糖氧化无色杆菌感染发生率高的报道，分别见于丹麦无色杆菌属感染的CF患者[72,73]，其发生率为38%；法国[54]和英国[74]的CF患者，其发生率为36%。CF患者常分离出的无色杆菌属其他细菌包括不适无色杆菌、疼痛无色杆菌、鲁兰无色杆菌和致病无色杆菌。

CF患者感染木糖氧化无色杆菌后肺功能改变不明显[52,66,75]。最近的一项研究表明，总体上，无色杆菌属细菌感染与肺功能恶化风险增加有关，但这似乎并不影响长期预后[71]。但是，感染鲁兰无色杆菌丹麦流行株可导致肺功能恶化[56]，并发现无色杆菌定植与慢性感染风险增加有关[73]。

(四)产碱杆菌属、凯斯特菌属、颇陌菌属和类产碱杆菌属

粪产碱杆菌可分离于各种临床标本，但是鉴定的准确性(特别是早期的报道)很难评估。粪产碱杆菌见于外科手术或者肿瘤治疗后并发的菌血症、眼部感染、胰腺脓肿、骨折后感染、尿及耳分泌物等[63]。也有CF患者痰中分离出粪产碱杆菌的散发病例报道[76]。腿伤凯斯特菌可分离于人类粪便、腿部伤口、痰和慢性耳部感染分泌物[8]；模仿凯斯特菌分离于腿部伤口和颈部脓肿[77]。斋戒颇陌菌分离于人类痰(包括CF患者的痰)和血液，还有一些未命名的颇陌菌属菌种也可以从痰或者血标本中分离出来[15]。迄今描述的2株人型类产碱杆菌分离自血液和尿标本[17]。

五、标本的采集、转运和保存

(一)百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌

用于培养和PCR检测的样本采集与患者的

年龄和临床的条件关系密切，而取样优劣显著影响敏感性。婴儿和年幼儿童适合采集鼻咽(nasopharyngeal，NP)抽取物；对于培养，这些标本比拭子更敏感。在年长儿童、青少年和成人，后鼻咽拭子更有效，也更优于咽拭子。鼻咽拭子的采集方法：轻轻地将拭子插入鼻后孔闭锁下鼻咽部，嘱患者稍微后仰鼻子。如有可能，应采集 2 份鼻咽拭子标本，每个鼻孔采集 1 份(https://www.cdc.gov/pertussis/clinical/diagnostic-testing/specimen-collection.html)。要使用小体积、涤纶或人造丝材料的拭子。也可使用更方便患者的植绒尼龙拭子，但是该拭子对于百日咳鲍特菌的 PCR 或培养法的适用性尚未经验证。藻酸钙拭子和铝杆拭子因可能抑制 PCR 反应不适用于 PCR[78]。应在抗菌治疗开始前采集样本[79]。

对于 NP 抽取物或拭子，转运时间至关重要，且需要使用防止细菌干燥的转运培养基。常用的细菌运送培养基如水解酪蛋白氨基酸培养基或者含活性炭的 Amies 培养基都可以使用，但是运送时间不应超过 48 h。半固体 Regan-Lowe (RL) 活性炭-血培养基可用于运送，且提供了百日咳鲍特菌的营养[41]。

对于 PCR 检测，拭子可以在室温干燥条件下运输。使用运送培养基如含活性炭的 Amies 培养基不会干扰 PCR 反应[79]。其他呼吸道标本，如痰标本或咽喉灌洗液，不太适用于 PCR 检测[2]。

(二)鲍特菌属其他菌种、无色杆菌属、产碱杆菌属、凯斯特菌属、颇陌菌属和类产碱杆菌属

对于鲍特菌属其他菌种，常规用的转运培养基即适合其运送。同样，产碱杆菌属、凯斯特菌属、颇陌菌属和类产碱杆菌属细菌可在多种环境及各种温度下存活。标准化的标本采集、转运和保存技术是保证从临床标本、医院的污染源和环境中检出这些细菌的必要条件。

六、直接检测方法

(一)核酸检测

受年龄、疫苗接种状态和症状持续时间的影响，PCR 法的敏感性较传统培养方法高 2～6 倍，且相对于传统培养方法数天出报告，实时荧光定量 PCR 法仅需要短短的几个小时[79-81]。模块化(block-based)和实时荧光定量 PCR 法的敏感性较接近[79,82-83]。PCR 法的敏感性随咳嗽时间延长而下降，但由于 PCR 法本身较高的敏感性，对于长达 4～6 周的咳嗽而言，仍可能是一种有效的诊断工具[79,81]。在疾病暴发时，家庭成员与感染者接触后即使出现轻微症状或无症状，其送检样本进行 PCR 检测同样可检出百日咳传播[84]。样本 DNA 提取时应避免影响 PCR 反应的干扰因素[79]，商品化 DNA 提取试剂盒相对而言更合适[79]，但缺乏正面对比数据。DNA 提取试剂盒有些经美国 FDA 核准和(或)具有 CE 标识，可用于临床检测。待测的多拷贝靶点有 *IS*481、*IS*1001 和 *IS*1002，其中 *IS*481 在百日咳鲍特菌体内的拷贝数约 200/细胞[35,81]，见于百日咳鲍特菌、霍姆鲍特菌和某些支气管脓毒鲍特菌；*IS*1001 在副百日咳鲍特菌体内的拷贝数约 20/细胞[85]，见于副百日咳鲍特菌；*IS*1002 见于百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌。上述 3 种 *IS* 多拷贝靶点的组合应用可鉴别与临床感染相关的鲍特菌属各菌种[86]，并与霍姆鲍特菌相鉴别[87]。目前的菌株与那些已测序的模式菌株相比较，*IS* 的数量仍保持稳定[85]。单基因的靶点包括 PT 启动子(*ptxA*-Pr)、*PT* 基因、霍姆鲍特菌的 *recA* 基因、丝状血凝素和孔蛋白基因，靶点总结见表 47-2[79-81,86-89]。

然而，单拷贝基因检测的敏感性一直低于基于多拷贝靶点 *IS*481 的 PCR 反应。可以应用特定序列的方法(荧光共振能量转移杂交探针、TaqMan 探针和分子信标)进行检测，也可以应用非特定序列形式(SYBR Green Ⅰ)检测[79]。鉴于特异性的考虑，大多数实验室采用特定序列的模式，且开发了双重或三重 PCR 方法用于临床感染相关的鲍特菌属各菌种的检测。多重 PCR 法可用于检测各种呼吸道病原体，包括鲍特菌属各菌种，但多数都是以 *IS*481 作为唯一的靶位[48]。外部质量控制计划一直在美国和欧洲国家贯彻实施[82,90]。除了实验室污染外，也曾有百日咳假暴发的报道(由临床物体表面存在的鲍特菌 DNA 污染拭子所致)[91]。

(二)直接荧光抗体染色(DFA)

DFA 方法检测 NP 拭子或抽吸物中百日咳鲍

特菌和副百日咳鲍特菌，方法快速而简便，但此方法缺乏敏感性和特异性，因而未被推荐采用[2]。核酸检测技术具备更高的敏感性和特异性，已广泛取代直接荧光抗体染色法。其他染色方法不适用于百日咳的诊断。

七、分离培养操作

(一)百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌

虽然培养方法的特异性近乎 100%，但是 PCR 几乎取代了培养方法而成为常规的诊断方法[79]。关于培养操作的详细信息见本手册以前的版本[92]。简而言之，各种培养基，如 RL 培养基、Bordet-Gengou(BG)培养基和 Stainer-Scholte 培养基，可用于培养百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌。大部分培养基加入头孢氨苄以抑制杂菌的生长。35～37℃常规空气条件下，培养时间至少 1 周。培养方法的敏感性取决于症状持续时间、年龄和免疫状态；对于症状持续数天且未免疫接种的年幼婴儿，培养方法的敏感性约为 60%，而对于咳嗽超过 3 周的青少年和成人，培养的敏感性<1%[92]。

(二)鲍特菌属其他菌种、无色杆菌属、产碱杆菌属、凯斯特菌属、颇陌菌属和类产碱杆菌属

临床标本中分离的鲍特菌属其他菌种(除外百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌)都是革兰阴性非发酵杆菌。表 47-4 列出其生长特性及部分生化反应，供参考。

表 47-4　鉴别临床相关鲍特菌属各菌种的生物学特征[a]

试验	百日咳鲍特菌	副百日咳鲍特菌	支气管脓毒鲍特菌	鸟鲍特菌	“亚洲监网鲍特菌”	欣氏鲍特菌	霍姆鲍特菌	派替鲍特菌	伤口鲍特菌	其他[b]
生长于										
RL 培养基	+(3～4 天)	+(2～3 天)	+(1～2 天)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
哥伦比亚琼脂	−	V	+	+	+	+	+	+	+	ND
麦康凯琼脂	−	−	+	+	+	+	(+)	+	+	ND
氧化酶	+	−	+	+	+	+	−	+	−	+
动力	−	−	+	−	V	+	−	−	+	+
色素	−	棕色	−	−	−	−	−	黄色	黄色	−

注：[a] +. ≥90%的菌株阳性；−. ≤10%的菌株阳性；(+). 可变的生长；V. 10%～89%的菌株阳性；ND. 未确定。[b] 其他包括支气管鲍特菌、呼吸鲍特菌、生痰鲍特菌和假欣氏鲍特菌

可应用普通培养基和肠道选择性培养基(如麦康凯培养基)从临床样本中分离无色杆菌属细菌。据报道，少数木糖氧化无色杆菌分离株在洋葱伯克霍尔德菌选择性氧化-发酵-多黏菌素 B-杆菌肽-乳糖琼脂(*Burkholderia cepacia* selective oxidative-fermentative-polymyxin B-bacitracin-lactose agar)或洋葱假单胞菌琼脂(*Pseudomonas cepacian* agar)上生长(分别占 30%和 20%)，而在洋葱伯克霍尔德菌选择性琼脂(*B. cepacian* selective agar)上不生长[93]。美国囊性纤维化基金会洋葱伯克霍尔德菌研究实验室和资源库(J. J. LiPuma，未发表的数据)及前期的研究[94]表明，大多数木糖氧化无色杆菌(约 60%)能够在洋葱伯克霍尔德菌选择性培养基上生长。

八、鉴定

(一)百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌

百日咳鲍特菌培养 3～7 天后出现肉眼可见菌落，副百日咳鲍特菌培养 2～3 天后即出现肉眼可见菌落。在 RL 培养基上菌落小，圆形，凸起，显银色光泽。副百日咳鲍特菌的菌落相对较大、光泽较弱。在博-金(Bordet-Gengou)培养基上微小的菌落周围有狭窄的 β 溶血环。百日咳鲍特菌是革兰阴性的小球杆菌，触酶和氧化酶阳性(副百日咳鲍特菌氧化酶阴性)。其鉴定可通过特异性抗体凝集反应进行确认。基本的生化反应特性见表 47-4。由于百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌营养

要求高，用于鉴定革兰阴性杆菌的商品化系统不能可靠鉴定这些菌种。16S rRNA 测序[95]和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）[68]可有效用于菌株的鉴定。MALDI-TOF MS 现已在很多医院临床实验室中用于鉴定一系列细菌病原体，包括鲍特菌属。

百日咳鲍特菌和少数副百日咳鲍特菌可发生位相变异[96]，如果必须保存菌株，应选用初代分离的临床菌株，−70℃冻存于甘油或者蔗糖-牛血清白蛋白培养基中。

（二）鲍特菌属其他菌种

鲍特菌属其他菌种的菌落形态学差异不大，均为小球杆菌，触酶阳性。多数情况下，可使用革兰阴性杆菌生化鉴定系统进行鉴定，如 API20 NE、Vitek（生物梅里埃，Marcy-l'Etoile，法国）、MicroScan（西门子，Eschborn，德国）、Phoenix（BD 公司，Franklin Lakes，新泽西）[97]或其他鉴定系统，这些鉴定系统经验证适用于包括一些鲍特菌属细菌在内的非发酵杆菌的鉴定。总体而言，上述生化鉴定系统对于这些细菌鉴定的特异性不是很高，对于 API20 NE 和 Vitek Ⅱ系统，如果生化鉴定结果显示不是“极好的”或“很好的”，建议采用 16S rRNA 基因测序的方法进行确认[97]。16S rRNA 基因测序或核糖体分型方法及 MALDI-TOF MS 可提供更加可靠的细菌鉴定结果，任一方法都可应用于医院临床实验室和参考实验室的菌种鉴定[68,98-100]。除支气管脓毒鲍特菌外，从临床标本中分离出鲍特菌属其他菌种是罕见的，因此，鲍特菌属其他菌种的鉴定应该由参考实验室进行确认，以避免鉴定错误[101]。

（三）无色杆菌属

无色杆菌属细菌仅能利用为数不多的糖类[9-11,13]，鉴于此，很难依据生化反应特性将其准确鉴定到属水平，推荐应用 16S rRNA 序列分析方法进行鉴定。同时，日益增加的分类学多样性和该属内种间的多样性，使得依据表型特征进行种水平的鉴定实在难以实现。已开发的 PCR 试验（基于 16S rRNA 基因）可用于木糖氧化无色杆菌的鉴定，但是无色杆菌属其他菌种及鲍特菌属的一些菌种也可出现阳性结果[102]。MALDI-TOF MS 已成功地用于鉴定木糖氧化无色杆菌[68,103]，有报道称，MALDI-TOF MS 甚至可以区分木糖氧化无色杆菌、鲁兰无色杆菌、罕见无色杆菌和少见无色杆菌[104]，而其他研究显示 MALDI-TOF MS 无法确切地将无色杆菌属鉴定到种水平[105-106]。此外，Desai 等[107]指出，表型鉴定为木糖氧化无色杆菌的菌株，MALDI-TOF MS 通常将其鉴定为鲁兰无色杆菌。值得注意的是，上述参考文献发表时间均早于近期有关无色杆菌属内多样性的描述（译者注：上述文献发表于 2012 年前，而致病无色杆菌、灵气无色杆菌、焦虑无色杆菌、疼痛无色杆菌、不适无色杆菌、居黏膜无色杆菌、肺无色杆菌和精气无色杆菌 8 个临床相关的新菌种的命名是在 2013—2014 年），因此，MALDI-TOF MS 鉴别无色杆菌各菌种的适用性有待进一步验证。所有已命名的无色杆菌属的菌种均可通过 *nusA*、*eno*、*rpoB*、*gltB*、*lepA*、*nuoL* 及 *nrdA* 的串联序列来区分[10,11,14]。很多研究表明，仅依据 *nrdA* 基因序列分析这一项就可以鉴别大多数的菌种[13,54,73-74,108]。

（四）产碱杆菌属、凯斯特菌属、颇陌菌属和类产碱杆菌属

对于产碱杆菌属、凯斯特菌属、颇陌菌属和类产碱杆菌属，同样推荐采用 16S rRNA 基因序列分析方法将这些菌准确鉴定到属水平。颇陌菌属不能同化乙酸苯酯，可据此与其邻近菌属相鉴别。凯斯特菌属菌株氧化酶阴性，腿伤凯斯特菌和模仿凯斯特菌可根据氧化 D-半乳糖醛酸和 D-葡糖醛酸的生化反应特性进行鉴别（腿伤凯斯特菌阳性，模仿凯斯特菌阴性），氧化 D-丝氨酸也可用于两者鉴别（腿伤凯斯特菌阴性，模仿凯斯特菌阳性）。粪产碱杆菌的显著特性是还原亚硝酸盐，而不能还原硝酸盐。人型类产碱杆菌不能同化枸橼酸盐。

九、分型系统

百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌的基因组同源性高[34]，仅某些多态性区域，如毒素基因（*ptx*）、毒素启动子（*ptxP*）和百日咳鲍特菌黏附素基因（*prn*）等，发生了一些不明机制的基因改变[109-110]。菌毛的表达可能受疫苗覆盖范围的影响而出现短暂的变化[110]。百日咳鲍特菌流行菌株可以通过以下多种方法进行分子分型，如常规

测序和二代测序技术[28,110]、脉冲场凝胶电泳、可变数目串联重复序列[也称作多位点可变数目串联重复序列分析(MLVA)][111-112]、限制性片段长度多态性[79]、单核苷酸多态性分型[113]、实时PCR[114]和其他方法[98]等,也有方法利用蛋白质组学作为区分参数[115]。根据情况可以选用不同的分型方法,但多数情况下分型结果不能够直接比较。类似的分型方法也可用于霍姆鲍特菌分离株[23]。

一些研究应用 XbaⅠ、SpeⅠ或 DraⅠ限制性内切酶消化木糖氧化无色杆菌,获得核酸片段后应用脉冲场凝胶电泳技术进行分子分型[52,55,116],据报道,该方法具有很高的分辨力。最近的一项研究数据显示,脉冲场凝胶电泳的分辨力高于多位点序列分型[54]。也有学者采用随机扩增多态性DNA PCR 法[51]和应用肠杆菌基因间重复一致序列或基因外重复回文序列引物 PCR 法[53]分型。两种多位点序列分型方法可用于所有已命名的无色杆菌属菌种的分型[14,117]。

十、血清学试验

百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌

在已接种的年长儿童、青少年和成人中,百日咳主要通过血清学试验确诊。酶联免疫吸附试验或者包被珠抗 PT 抗体水平定量试验是推荐的血清学诊断方法[118-120],试验时可以采用成对(急性期和恢复期)或单个血清标本。成对样本血清学试验是最适的诊断方法[121],但是单个样本血清学试验在年长儿童、青少年和成人诊断中也表现出很好的敏感性和特异性[118,122-123]。WHO 提供了人类百日咳血清学试验的参考方法[124],定量的百日咳血清学试验结果应报告为 U/ml。对于单样本血清学试验,抗 PT 的 IgG 抗体<40 U/ml 时表明近期无接触,而结果>100 U/ml 可以作为近期接触细菌的证据[119,125-127]。抗 PT 的 IgG 抗体是首要检测的抗体,抗 PT 的 IgA 抗体可以作为不确定结果的补充试验(>40 U/ml 和<100 U/ml)。不推荐检测 IgM 抗体,也不建议使用其他方法,如免疫印迹法、补体结合法、凝集法或者其他检测方法[119]。血清学方法不能检测副百日咳鲍特菌感染,也无法区分疫苗和感染引起的百日咳鲍特菌免疫反应(有症状或无症状感染)[119,125,128]。商品化试剂的质量参差不齐,有待进一步标准化[128-129]。对于1年内接种过非细胞疫苗的患者,百日咳血清学试验结果解释不可靠[119]。目前,已经有百日咳血清学试验的外部质量控制程序[129]。

十一、抗菌药物敏感性试验

(一)百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌

百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌体外对多种抗菌药物敏感,包括一些青霉素类、大环内酯类、酮内酯类、喹诺酮类、四环素类、氯霉素及甲氧苄啶-磺胺甲噁唑,而对大部分口服头孢菌素类药物耐药[2]。与其他的细菌性疾病相反,这些抗菌药物的药代动力学和药效动力学与细菌体外药敏结果之间确切关系尚不清楚。此外,抗菌药物对百日咳症状的严重程度或持续时间的影响无明确的资料记载[40,130]。

百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌药敏试验方法没有标准化。如果进行药敏试验,其方法包括宏量和微量肉汤稀释法、琼脂稀释法、折点法和E试验法,而大多数情况下,纸片扩散法是不可行的[40],红霉素耐药性可以通过纸片扩散法来评估,使用不含抗生素的活性炭-马血(RL)培养基,贴15 μg 的红霉素纸片进行检测。自20世纪60年代以来,收集的菌株中存在红霉素耐药株,但在美国和其他的一些国家,很少发现红霉素耐药株。中国百日咳鲍特菌菌株的基因型分析显示,红霉素的耐药性(由23S rRNA 大环内酯类药物结合域的突变介导)正在增加[131-132],但迄今为止,红霉素耐药性在全球范围内播散的数据有限[40]。常规不推荐对百日咳鲍特菌进行药敏试验,在出现特殊的临床或流行病学情况下,应进行药敏试验[40]。百日咳鲍特菌分离株的持续监测也应该包括抗菌药物敏感性试验。

(二)鲍特菌属其他菌种

支气管脓毒鲍特菌可以产生一种β-内酰胺酶[133],对多种青霉素类和头孢菌素类耐药,多数情况下对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑耐药[134]。一项对犬科和猫科分离株的研究[135]表明,大多数分离株对阿莫西林/克拉维酸、四环素、庆大霉素和一种喹诺酮类药物敏感。鸟鲍特菌对头孢呋辛、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑和四环素耐药,对氨苄西林、美洛

西林和庆大霉素敏感[134]。鲍特菌属其他菌株的药敏试验报道应与其他罕见分离的苛养非发酵革兰阴性杆菌等同视之。在这些情况下，体外耐药结果不代表临床治疗无效。

(三)无色杆菌属

耐药现象普遍，木糖氧化无色杆菌[136]仅对亚胺培南、哌拉西林、替卡西林-克拉维酸，头孢他啶和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑敏感。氨基糖苷类、广谱的头孢菌素(不包括头孢他啶)和喹诺酮类药物显示无活性。大多数菌株对常规剂量的妥布霉素耐药，41%的菌株可以被高浓度喷雾装的妥布霉素抑制。同样，92%的菌株可以被高剂量的黏菌素(100 μg/ml)抑制。抗菌药物联合应用通常不产生协同作用，但有研究显示氯霉素-米诺环素、环丙沙星-亚胺培南和环丙沙星-美罗培南联合应用时存在相加作用[137]。木糖氧化无色杆菌对阿奇霉素和克拉霉素耐药，仅在阿奇霉素与美罗培南或者与甲氧苄啶-磺胺甲噁唑联合用药时才可观察到轻微的协同作用和(或)相加作用[138]，这些数据与一些小样本的临床研究和病例报道相符[49,52-53,139]。无色杆菌属其他菌种药敏数据十分罕见，少见无色杆菌和罕见无色杆菌对大部分受试的喹诺酮类、大环内酯类和头孢菌素类耐药[9]；一株分离自血液的皮氏无色杆菌对氨苄西林、头孢泊肟和庆大霉素耐药，但对其他受试的抗菌药物均敏感[140]。分离于丹麦 CF 患者的 90%以上无色杆菌属分离株对阿米卡星、环丙沙星和妥布霉素耐药，尤其是出现高水平的氨曲南耐药(>256 μg/ml)和磷霉素耐药(>1024 μg/ml)的菌株[141]。最低的 MIC 见于美罗培南(94%菌株敏感)、哌拉西林-他唑巴坦(所有菌株敏感)和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑。2 个常用于吸入性治疗的抗生素，黏菌素(MIC_{90} = 8 μg/ml)和头孢他啶(MIC_{90} = 24 μg/ml)，显示很好的抗菌活性[141]。类似很多其他细菌，无色杆菌属细菌容易在体外形成生物膜，由于抑制生物被膜作用的药物浓度高于药物可达到的雾化浓度，外被生物被膜的细菌对很多抗菌药物的敏感性显著降低[142-143]。然而，少数菌株对左氧氟沙星和妥布霉素显示出 MIC 和生物膜被抑制浓度值低于药物可达到的雾化浓度[143]。

(四)产碱杆菌属、凯斯特菌属、颇陌菌属和类产碱杆菌属

粪产碱杆菌对抗菌药物的敏感性较木糖氧化无色杆菌高，大部分粪产碱杆菌对阿莫西林、替卡西林、氨曲南、卡那霉素、庆大霉素和萘啶酸耐药，而对阿莫西林-克拉维酸或替卡西林-克拉维酸、各种头孢菌素和环丙沙星敏感[144]。虽然近期报道的 2 株菌对环丙沙星耐药[145]，但大部分凯斯特菌属菌株对环丙沙星和头孢噻肟敏感[8]。近期研究显示，凯斯特菌属临床分离株对头孢吡肟、庆大霉素和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑敏感[145-146]。目前尚无颇陌菌属和类产碱杆菌属药物敏感性数据。

十二、结果的评价、解释和报告

百日咳和副百日咳病例诊断方法的有效性取决于症状的持续时间(图 47-1)。在美国[147]和其他地区，核酸扩增试验是直接检测百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌的首选方法，因为该方法具有很好的敏感性和检测速度，实时定量 PCR 方法的结果解释和报告的建议见表 47-3。

虽然培养方法仅在新生儿和未免疫接种的婴儿中敏感性足够高，但是一旦培养分离出百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌，就意味着感染。不需要对菌株进行常规的药敏试验。然而，培养仍为必需，尤其是监测百日咳鲍特菌和副百日咳鲍特菌的流行菌株。

百日咳血清学诊断通常采用单样本血清学方法。对于近 1 年接种过非细胞百日咳疫苗的患者而言，难以正确解释血清学试验的结果。抗 PT 的

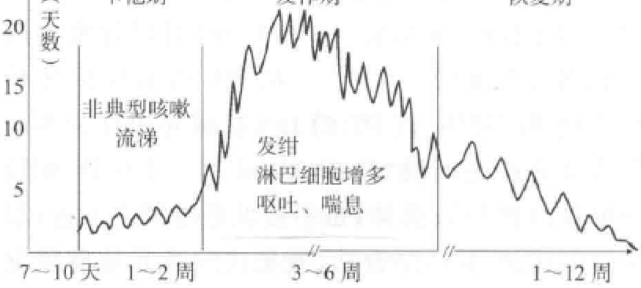


图 47-1 百日咳的症状和诊断程序示意图(Nicole Guiso 提供，巴斯德研究所，巴黎，法国)，见彩插

IgG抗体水平≥100 U/ml表明有近期接触史。对于青少年和成人，抗PT的IgG抗体水平<40 U/ml可解释为无近期感染的指征[119]。除马萨诸塞州外，美国的其他地区不接受血清学试验作为病例确诊的方法。许多欧洲国家出台了法定准则和实验室确证方法，接受血清学方法作为感染的证据之一。

类似于其他罕见的革兰阴性非肠道杆菌，从临床标本中分离出无色杆菌属、产碱杆菌属、凯斯特菌属、颇陌菌属及类产碱杆菌属细菌后，微生物实验室和临床医生间应逐个病例进行讨论以确定其临床相关性。应对这些菌种进行抗菌药物敏感性试验，以帮助指导治疗决策。

参考文献请扫二维码查阅

第48章 弗朗西斯菌属*

ELIZABETH A. DIETRICH, JEANNINE M. PETERSEN

（陈茶 译；王倩、王辉 审校）

土拉热是一种可致人和动物急性死亡的疾病，其病原体是土拉热弗朗西斯菌（*Francisella tularensis*）。人类感染土拉热弗朗西斯菌的主要途径包括：节肢动物的叮咬、与感染动物的直接接触、吸入感染性气溶胶、摄入污染的食物或污染的水源等。该菌感染性强，仅10个细菌即可致病，故引起实验室获得性感染（laboratory-acquired infections）的风险度高。该菌曾作为潜在生物武器而进行研究，被美国政府列为一级病原微生物（tier 1 select agent），并且是6个最有风险的细菌之一；如被刻意使用，会产生大规模人员伤亡，并对经济、公共基础设施或公众信心造成毁灭性后果。

在弗朗西斯菌属中，除土拉热弗朗西斯菌外，其他弗朗西斯菌菌种大部分是环境菌而鲜为人知。新凶手弗朗西斯菌（*F. novicida*）、蜃楼弗朗西斯菌（*F. philomiragia*）和西班牙弗朗西斯菌（*F. hispaniensis*）可以在免疫力低下人群中引起罕见的机会性感染。其他弗朗西斯菌菌种还包括水生生物的病原体、水生环境中分离的环境菌，以及蜱虫内共生菌。

一、分类学

弗朗西斯菌科（Francisellaceae）隶属于γ变形菌纲的硫发菌目，该科目前包括2个属，即弗朗西斯菌属和另弗朗西斯菌属（*Allofrancisella*）。因另弗朗西斯菌属（*Allofrancisella* spp.）属于环境菌，尚未发现与疾病相关，故本章不再详述[1]。目前，已经有数篇文献综述了该属的成员和发展历史[2-4]。最初，弗朗西斯菌属被认为是一个小菌属，只包括土拉热弗朗西斯菌、新凶手弗朗西斯菌、蜃楼弗朗西斯菌3个种。然而，近十年来的研究发现，弗朗西斯菌在环境中广泛存在。目前，该菌属已包括土拉热弗朗西斯菌、新凶手弗朗西斯菌、蜃楼弗朗西斯菌、西班牙弗朗西斯菌、船城弗朗西斯菌（*Francisella noatunensis*）、杀鲍鱼弗朗西斯菌（*Francisella halioticida*）、波斯弗朗西斯菌（*Francisella persica*）等多个种（http://www.bacterio.net/francisella.html），以及一些未分类的弗朗西斯菌。

土拉热弗朗西斯菌是弗朗西斯菌属中最具临床意义的菌种，可以在人类和广泛的动物中引起人畜共患性的土拉热。该菌种首次分离于加利福尼亚Tulare县（Tulare County，CA）一只患有“鼠疫”样疾病的松鼠中（译者注：土拉热弗朗西斯菌菌种名“*tularensis*”源于地名Tulare）。目前，该菌种分为3个亚种，即土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种（*Francisella tularensis* subsp. *tularensis*）（A型）、土拉热弗朗西丝菌全北极亚种（*Francisella tularensis* subsp. *holarctica*）（B型）和土拉热弗朗西丝菌中亚亚种（*Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*），其在1.1 Mb基因组序列的平均核苷酸一致率（average nucleotide identity，ANI）≥99.2%[5]。

新凶手弗朗西斯菌和蜃楼弗朗西斯菌最初均分离于盐水源[6-8]，两者在血清学、毒力和生化特性方面均与土拉热弗朗西斯菌存在显著的差别[8-9]。蜃楼弗朗西斯菌在系统发育关系上与土拉热弗朗西斯菌有一定差异，且两者的基因组

*注：本章包含Jeannine M. Petersen和Martin E. Schriefer在本手册第11版第46章中呈现的部分内容

ANI＜83%[4,10]。然而，新凶手弗朗西斯菌与土拉热弗朗西斯菌具有高度的基因相似性，故有学者曾提议它是土拉热弗朗西斯菌的第 4 个亚种[6,11]，但全基因组序列比较的证据表明，两者是从 2 个明显不同的种群系谱进化而来，这与新凶手弗朗西斯菌和土拉热弗朗西斯菌分属不同菌种的说法一致[5,12-13]，并且，临床和生态学上的差异也进一步支持了不同菌种之说[12-13]（见下文"流行病学和传播"和"临床意义"部分）。

西班牙弗朗西斯菌是一种罕见的机会性病原体，目前在西班牙和澳大利亚有 3 例临床感染报道[11,14-16]（译者注：西班牙弗朗西斯菌在中国有溺水性肺炎和血流感染的临床病例）。西班牙弗朗西斯菌与新凶手弗朗西斯菌和土拉热弗朗西斯菌的基因组 ANI 接近 90%，而与蜃楼弗朗西斯菌的基因组 ANI 为 83%[10]。另有一个可引起人机会性感染的弗朗西斯菌，暂命名为"机会弗朗西斯菌（*Francisella opportunistica*）"，已有在美国几个免疫力低下患者的培养物中分离（译者注：机会弗朗西斯菌已于 2019 年 12 月在原核生物分类的官方期刊 *IJSEM* 杂志发表）。

船城弗朗西斯菌和杀鲍鱼弗朗西斯菌分别是盐水鱼类和大鲍鱼的病原菌[18-20]。这 2 个菌种在系统发育上与蜃楼弗朗西斯菌聚类在同一进化枝[4]。其他菌株则来源于水生环境中，包括海水和冷却塔的空调水[10,21]。波斯弗朗西斯菌（*Francisella persica*）是一种蜱虫内共生菌（tick endosymbiont），先前被描述为波斯沃尔巴克菌（*Wolbachia persica*），但通过序列分析分类为弗朗西斯菌属[22]。波斯弗朗西斯菌基因组与新凶手弗朗西斯菌基因组的 ANI 值接近 89%，但波热弗朗西斯菌存在基因组缩减，与其作为内共生菌的地位一致[10,22]。其他弗朗西丝菌样共生体（*Francisella*-like endosymbionts）已通过测序分析从多种蜱虫内检测到，但尚未培养或未获得正式的分类学地位[2,23-24]。

二、属的描述

弗朗西斯菌属细菌为革兰阴性球杆菌，菌体细小，大小范围为 0.2～1.7 μm，与其他类似菌属的鉴别要点见表 48-1。该菌属细菌对革兰染色复染液（沙黄）的吸收能力较差（译者注：意即革兰染色着色较淡）；严格需氧，触酶弱阳性，脲酶阴性、无动力、无芽胞，仅对少数的碳氧化合物有代谢活性（表 48-2）。大部分菌种只分解少数的几种糖类，如葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和甘油，只产酸不产气。该菌属具有独特的细胞脂肪酸特征[2,6,25]。对于大多数菌种，补充半胱氨酸可促进其体外的生长能力[2,17-18]。一些重要的生物学特征，如氧化酶活性、6%氯化钠营养肉汤生长试验、最适生长温度和糖发酵试验等，可用于弗朗西斯菌属不同菌种之间的鉴别（表 48-2）。弗朗西斯菌属内可培养的菌种之间 16S rRNA 基因序列一致性＞95%[2,17-18]。尽管一些环境菌种亲缘关系较远，但属内所有临床相关菌种的基因组 ANI 值＞80%[10]。土拉热弗朗西斯菌 3 个亚种所有菌株之间的基因组 ANI 值＞99%，而新凶手弗朗西斯菌与土拉热弗朗西斯菌的基因组 ANI 接近 97%～98%[10]。

表 48-1　弗朗西斯菌与其他类似革兰阴性菌的鉴别[a]

试验	土拉热弗朗西斯菌	布鲁菌属	巴尔通体属[b]	不动杆菌属	嗜血杆菌属[c]	鼠疫耶尔森菌	多杀巴斯德菌
氧化酶	－	＋	－	－	V	－	＋
脲酶	－	＋	－	－	V	－	－
革兰染色形态	非常细小的球杆菌	细小的球杆菌	细杆菌	宽球杆菌	小球杆菌	小杆菌	小球杆菌
标本来源	溃疡、伤口、血、淋巴结抽吸物、呼吸道	血、骨髓	血、骨髓、淋巴结	V	血、脑脊液、其他	血、淋巴结抽吸物、呼吸道	伤口、血、呼吸道
X/V 因子需求	－	－	－[d]	－	＋	－	－
半胱氨酸增强作用	＋	－	－	－	－	－	－
动力	－	－	－	－	－	－	－

注：[a]＋. 阳性率≥90%；－. 阳性率≤10%；V. 可变（阳性率力为 11%～89%）；[b]不包括唯一的运动型菌种——杆状巴尔通体；[c]嗜血杆菌属细菌需要 X 因子和 V 因子或只需要 V 因子；[d]X 因子（血红素）不是必需的，但可促进多种菌株的生长

在该菌属中，土拉热弗朗西斯菌是对哺乳动物毒力最强的菌种。采用皮下或皮内接种实验小鼠，土拉热弗朗西斯菌50%致死量(LD_{50})为1～10个细菌，而新凶手弗朗西斯菌的LD_{50}为10～10^7个细菌[13]。土拉热弗朗西斯菌亚种的毒力亦不相同，对兔子进行皮下接种，土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种的LD_{100}<10个细菌，而土拉热弗朗西斯菌全北极亚种的LD_{100}为10^9个细菌[26]。滴鼻接种实验小鼠，蜃楼弗朗西斯菌的LD_{50}为3.45×10^3个细菌[27]。而对于船城弗朗西斯菌，小鼠腹腔接种10^7个细菌未见死亡[28]。

表 48-2 弗朗西斯菌属内各菌种的特征[a]

特征	土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种	土拉热弗朗西斯菌全北极亚种	土拉热弗朗西斯菌中亚亚种	新凶手弗朗西斯菌	蜃楼弗朗西斯菌	西班牙弗朗西斯菌	船城弗朗西斯菌	杀鲍鱼弗朗西斯菌
革兰染色(培养)，沙黄复染色	着色弱，多形性，单个，极少链状，革兰阴性小球杆菌	同土拉热弗朗西斯菌土拉亚种	同土拉热弗朗西斯菌	同土拉热弗朗西斯菌	同土拉热弗朗西斯菌	着色弱，革兰阴性多形球杆菌	着色弱，革兰阴性球杆菌	革兰阴性球杆菌
菌体大小(μm)	(0.2～0.7)×0.2	(0.2～0.7)×0.2	(0.2～0.7)×0.2	0.7×1.7	0.7×1.7	0.5×1.5	NT	0.5～1.0
血平板上生长情况	+/-；标本中外源性半胱氨酸弱生长	+/-；同土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种	+/-；同土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种	+	+	+	-	NT；在Eugon琼脂上生长需要70%的人工海水
半胱氨酸心浸出液琼脂(CHAB)生长情况	48 h；菌落直径1～2 mm，凸起，光滑，边缘整齐，有浅绿色和白色光泽	同土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种	NT	48 h；同土拉热弗朗西斯菌，但直径为2～4 mm	48 h；直径>4 mm，灰白色奶油样，黏液状，光滑，有浅紫色着色的白色光泽	48 h；直径3～4 mm，凸起，苍白到灰色	4天；菌落凸面低，白色，半透明，黏液型	10～14天；浅灰色到白色，圆形，边缘整齐，稍凸起
在NB上生长情况(6%氯化钠)	-	-	-	+	+	NT	-	+
最适生长温度(℃)	35～37	35～37	35～37	35～37	25或37	37	22℃；37℃不生长	20℃；37℃不生长
触酶	±	±	±	±	±	±	±	+
氧化酶	-	-	-	-	+	+	-	-
产酸：								
葡萄糖[b]	+	+	-	+	±	+	V	-
麦芽糖	+	+	-	V	+	-	-	NT
蔗糖	-	-	+	+	V	+	-	-
甘油	+	-	+	+	-	+	NT	NT
瓜氨酸酶	+	-	+	+	NT	NT	NT	NT
与土拉热弗朗西斯菌比较的ANI(%)	>99	>99	>99	97～98	82	90	82	80
与土拉热弗朗西斯菌比较的16S rRNA一致率(%)	>99	>99	>99	>99	99	>99	97	96

注：[a] V. 可变或反应慢；NT. 未检测；NB. 营养肉汤；[b] 延迟或可变反应

目前，所有已命名的弗朗西斯菌种已经完成了全基因组测序，还有少数菌株尚未正式分类到该属[4,10]。弗朗西斯菌基因组只包含一条单一的染色体，大多数情况下基因组长度为1.9 Mb，G+C含量为32%（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Francisella）。有人在某些弗朗西斯菌种中发现了质粒，包括新凶手弗朗西斯菌和蜃楼弗朗西斯菌，但对于某一特定菌种而言，并非所有菌株都含质粒[29]。全基因组分析表明，土拉热弗朗西斯菌与其他弗朗西斯菌种相比，仅含有少数几个独有基因[4]，且土拉热弗朗西斯菌基因组的一个显著的特征为编码非典型Ⅵ分泌系统的弗朗西斯菌毒力岛（*Francisella* pathogenicity island）是重复的，该毒力岛基因对于弗朗西斯菌的胞内寄生和毒力是必需的[30]，但在当前所有测序的其他弗朗西斯菌中，该毒力岛基因均为单拷贝存在[10]。

三、流行病学和传播

土拉热弗朗西斯菌最初仅发现于北半球，但最近在澳大利亚有少数土拉热弗朗西斯菌全北极亚种的报道[31-32]（表48-3）。土拉热弗朗西斯菌各亚种之间在北半球的分布也存在差异[3,24,33-34]。土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种的感染仅出现在北美，中亚亚种仅在中亚和俄罗斯发现[35]，而全北极亚种的感染分布较广且遍布整个北半球。在美国，土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种的A1亚型（也叫A.Ⅰ亚型）主要分布在美国东半部，而A2亚型（也叫A.Ⅱ亚型）主要分布在美国西部[36-38]。

表48-3　引起人类感染的弗朗西斯菌及其流行病学[a]

弗朗西斯菌种	感染源	地理分布（文献报道案例）	疾病（人类）
土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种（A型）	动物（主要是兔和猫），扁虱，鹿虻	北美（美国和加拿大）	土拉热（所有类型），严重疾病
土拉热弗朗西斯菌全北极亚种（B型）	动物（主要是啮齿动物），扁虱（欧洲蚊子）	北半球（澳大利亚）（译者注：澳大利亚不属于北半球，故应修订为：北半球和澳大利亚）	土拉热（所有类型），中度到严重疾病
新凶手弗朗西斯菌	盐水	美国	非常罕见，温和疾病（主要为免疫缺陷患者）
蜃楼弗朗西斯菌	盐水	美国、土耳其、瑞士、澳大利亚，法国（译者注：中国有分离报道）	非常罕见，温和疾病（主要为免疫缺陷患者）
西班牙弗朗西斯菌	未知	西班牙、澳大利亚（译者注：另在中国和泰国有分离报道）	非常罕见
“机会弗朗西斯菌”和未分类的弗朗西斯菌种	未知	美国	非常罕见

注：[a]文献报道的人类感染

尽管土拉热弗朗西斯菌有着广泛的地理分布，但总的发病率疑似较低[3]。俄罗斯和哈萨克斯坦是公认的高发流行区。此外，芬兰、瑞典和美国3个地区的发病率可能较高[3,34,39]。在美国，土拉热每年感染的病例100～200例[40]，且除了夏威夷州外的各个州均有报道，其中报道病例最多的是中南部的密苏里州、阿肯色州、马萨诸塞州和俄克拉荷马州，而在2015年，美国科罗拉多州、怀俄明州、南达科他州和内布拉斯加州的土拉热病例增加，这可能是啮齿动物和兔子数量增加而导致的结果[41]。近几年的病例统计可在美国疾病预防控制中心（CDC）网站上查阅（http://www.cdc.gov/tularemia/statistics）。而在欧洲，在2008—2014年间，平均每年报道700例[42]，具体数据可见相关网站（https://ecdc.europa.eu/en/tularaemia/surveillance-and-disease-data/disease-data-atlas）。

人土拉热主要发生在农村，城市病例少见；且大部分发生在夏天，传播途径包括蜱虫或鹿虻叮咬、接触感染动物（如剥了皮的兔子）[3,36]。在园林绿化时吸入感染性的气溶胶、接触感染的病猫也是重要的危险因素[36,43-44]。而男性感染的病例

报道远高于女性，这可能与男性更容易从事猎杀动物和园林绿化的工作有关。土拉热大多为散发，而暴发罕见。美国出现 2 次土拉热暴发，一次是 2000 年玛莎葡萄园（Martha's vineyard）暴发的与园林美化活动有关的肺土拉病[43]，一次是 2007 年犹他州暴发的由鹿虻叮咬引起的溃疡腺型土拉热[45]。在 1964－2004 年，美国 316 株人感染分离株中，66％是土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种，34％是土拉热弗朗西斯菌全北极亚种[46]。

土拉热弗朗西斯菌是一种动物源性的病原体，可感染各种各样的动物，包括哺乳动物、两栖动物和鸟类等脊椎动物，以及无脊椎动物的节肢动物[24,47]。在美国，最常见的传播人类土拉热的节肢动物是蜱类[革蜱种（*Dermacentor* spp.）、美洲花蜱（*Amblyomma americanum*）]和鹿虻[斑虻种（*Chrysops* spp.）][48]。在瑞典，蚊子是与土拉热弗朗西斯菌传播有关的主要媒介[48]。而对于脊椎动物而言，土拉热弗朗西斯菌最容易感染啮齿类动物和其他哺乳类动物，尤其是野兔和家兔。但不论是对于脊椎动物还是无脊椎动物，土拉热弗朗西斯菌的感染都是致命的。

与土拉热弗朗西斯菌的不同之处在于新凶手弗朗西斯菌和蜃楼弗朗西斯菌 2 个种不在动物或节肢动物宿主之间传播。有蜃楼弗朗西斯菌从麝鹿和狗身上分离到[49-50]。节肢动物感染新凶手弗朗西斯菌和蜃楼弗朗西斯菌，尚未有鉴定。人感染该 2 种细菌似乎与盐水源的接触（如淹溺）相关[7,51]。据报道，人类暴发过一次新凶手弗朗西斯菌感染疾病，发生在一所惩教所的囚犯中，与共同使用室外制冰机的冰块有关[52]。

大部分的新凶手弗朗西斯菌分离株来自北美[16,53]。同样，蜃楼弗朗西斯菌亦主要分离于北美，但法国、瑞士、土耳其和澳大利亚亦有分离报道[6,7,16,54-56]（译者注：近年来，中国已从血液和无菌体液中分离到蜃楼弗朗西斯菌和西班牙弗朗西斯菌）。

四、临床意义

（一）土拉热弗朗西斯菌

全球范围内的土拉热均由土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种（A 型）和土拉热弗朗西斯菌全北极亚种（B 型）引起。历史上，土拉热有多种不同的称谓，如兔热病（rabbit fever）、鹿虻热（deerfly fever）、市场人病（market men's disease）、腺型蜱传热（glandular type of tick fever）、Ohara 病或 yato-byo 病、捕捉水鼠病（water rat trappers' disease）等。该病的不同称谓证实了其临床症状的多样性，并且，由于其病原菌在自然界中无处不在，人类获得感染的途径也是多样的。

土拉热的临床表现取决于传播方式、感染菌株的毒力、宿主的免疫状况及诊断与治疗的及时性[57]。该病由于病例少见和症状不典型而很容易被误诊。土拉热的临床特征性表现为：突发的寒战、发热、头痛和全身不适症状。临床上，需与土拉热鉴别诊断的疾病包括各种感染性疾病，如猫抓热、分枝杆菌感染、炭疽、布鲁菌病、军团菌病、鼠疫及社区获得性肺炎等[57-58]。

土拉热感染潜伏期为 1～21 天，典型为 3～5 天[57,59]。疾病的表征（即症状和体征）与细菌入侵的途径相关，但所有类型的土拉热都伴随着发热[57]。土拉热的临床症状可表现为溃疡腺体型、腺体型、眼腺体型、伤寒型和肺炎型[57,58]。最常见的类型是溃疡腺体型（占所报道病例的 45％～80％），其入侵是通过感染节肢动物的叮咬或其他穿透皮肤屏障的接种方式。腺型与溃疡结节型类似，但感染部位不发生溃疡。眼型常通过手眼接触，将病原菌从感染源转移到眼里而引起，结膜是最初的感染部位。口咽型常因为误食污染的食物或饮用污染的水源引起，可引起口咽部的淋巴结肿大。肺炎型常因直接吸入病原菌引起，是最严重的土拉热类型。因伤寒型缺乏可识别的入侵途径和局部体征，成为土拉热中最难确定的类型，若不治疗，细菌从感染部位扩散会引起继发的临床病症，如脓毒症。

土拉热感染的严重程度，可以在轻度的自限性感染到严重的致死性感染之间变化，且很大程度上取决于感染菌株。欧洲和亚洲只有土拉热弗朗西斯菌全北极亚种引起的土拉热，几乎没有由土拉热引起的死亡报道[34]。而在美国，土拉热感染的病原体是土拉热弗朗西斯菌全北极亚种或毒力更强的土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种，病死率为 2.3％～9.0％[49,60]。在美国地区以培养确诊的土拉热例中，土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种 A1 群菌株感染的病死率，明显高于土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种 A2 群或土拉热弗朗西斯菌全北极

亚种[36,38]。

土拉热弗朗西斯菌的第3个亚种——土拉热弗朗西斯菌中亚细亚亚种仅分离于中亚地区，尽管此菌对人类的致病情况尚无文献报道，但家兔毒力实验研究表明，其毒力与土拉热弗朗西斯菌全北极亚种相当[35]。

(二)新凶手弗朗西斯菌和蜃楼弗朗西斯菌

新凶手弗朗西斯菌和蜃楼弗朗西斯菌引起的人类感染非常罕见，这些病原菌主要感染免疫力低下的患者。全球报道的新凶手弗朗西斯菌感染病例少于20例[52]，健康个体感染后，表现为轻微的症状(无发热，局部淋巴结肿大)，淋巴结中可分离到病原菌；而免疫力低下患者(主要是有潜在肝疾病的患者)感染后有发热症状，并可以从血液标本中分离到病原菌。另外，新凶手弗朗西斯菌也与溺水后感染有关[51]。

与之类似的是，已报道的蜃楼弗朗西斯菌感染亦少于20例[61]{译者注：中国有蜃楼弗朗西斯菌相关报道[参考文献：张磊，叶大柠，朱焱，等．10株蜃楼弗朗西斯菌的鉴定与特征分析．临床检验杂志，2017，035(004)：271-276]}。除1例病例外，其他病例都涉及宿主物理屏障(溺水)或免疫防御系统的损害(慢性肉芽肿病)。溺水和水源暴露的病例与盐水和苦咸水有关，这与淡水源相关的土拉热弗朗西斯菌感染病例形成鲜明对比。

(三)西班牙弗朗西斯菌

文献报道的人感染西班牙弗朗西斯菌病例仅有3例[11,14-16]。第一例为澳大利亚患者，其在咸水中足部受伤[16]，其分离株最初描述为“新凶手弗朗西斯菌样(*F. novicida*-like)”细菌[10]，随后被重新分类为西班牙弗朗西斯菌。第一例被确认为由一个独立菌种引起的病例，发生在西班牙的一名原本健康且免疫功能正常的患者，其感染后出现发热、肌痛、腹泻和左下背部疼痛，同时在患者的血液和尿标本中分离到该病原菌[15]。在最近的一例病例中，西班牙弗朗西斯菌分离于一名急性发热患者的血液标本，该患者免疫力低下，且曾经被鱼钩刺伤过[14]{译者注：中国有西班牙弗朗西斯菌分离鉴定[参考文献：张磊，郑敏玲，王亚，等．基于高通量测序的平均核苷酸一致性在1株弗朗西斯菌鉴定中的应用．临床检验杂志，2017，035(007)：499-502]；另泰国报道的1株“新凶手样(*novicida*-like)”细菌[参考文献：Whipp MJ. Characterization of a *novicida*-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. Journal of Medical Microbiology，2003，52(9)：839-842]，其基因组测序的结果证实为西班牙弗朗西斯菌}。

(四)其他弗朗西斯菌

一个新的弗朗西斯菌种，暂时命名为机会弗朗西斯菌(*Francisella opportunistica*)，其一株于2005年分离于1例美国患者的脑脊液中，另一株于2006年分离于1例美国患者的血液中[10,17][译者注：第3株于2014年分离于1例美国患者血液中，并正式命名为“机会弗朗西斯菌”(参考文献：Dietrich EA，Kingry LC，Kugeler KJ et al. *Francisella opportunistica* sp. nov.，isolated from human blood and cerebrospinal fluid. Int J Syst Evol Microbiol，2019，doi：10.1099/ijsem.0.003891)]。另一个新的弗朗西斯菌种，2011年分离于1例美国患者的皮肤伤口中[62]。

五、标本的采集、运输和保存

在美国，土拉热弗朗西斯菌被分类为一级病原微生物(Tier 1 select agent)(第15章)。对于土拉热弗朗西斯菌，临床实验室应了解美国微生物学会概述的哨点级临床微生物学实验室(sentinel-level clinical microbiology laboratory)的相关指南(https://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines)。接收和保存土拉热弗朗西斯菌的实验室，必须在联邦生物恐怖病原体程序(Federal Select Agent Program，http://www.selectagents.gov)系统中进行注册。对于不保存生物恐怖病原体(select agents)的实验室，可以不进行注册，但一旦确定为生物恐怖病原体，临床实验室必须在确诊后的7天内销毁或者转移生物恐怖病原体(包括分离出菌株的临床标本)。在欧盟和俄罗斯，土拉热弗朗西斯菌也分别被分类为非常高危群(very-high-threat group)病原微生物和1群(group 1)病原微生物[63]。

直接检测的标本选择通常取决于临床疾病的类型[57]。全血标本适用于所有类型的土拉热，但全血标本可能会出现假阴性，特别是在疾病早期。

肺炎型或口咽型土拉热可采用咽拭子、支气管或气管灌洗液或抽吸物、痰、经胸腔的肺部抽吸物和胸腔积液(如存在)标本等。溃疡腺体型或眼腺体型土拉热最常采用可见病灶或感染区域的拭子标本。淋巴结或病灶的抽吸物可用于诊断溃疡淋巴结型、腺体型和口咽型土拉热。适用于动物尸检的标本类型则包括可见的脓肿拭子、淋巴结、肺组织、肝组织、脾组织和骨髓标本。

对于培养鉴定的标本,由于正常菌群的污染会影响结果的判断,因此,标本采集前的皮肤表面消毒非常重要。为保持病原菌活性,标本需在24 h内且最好在2 h内送达实验室。若转运时间>24 h,则标本需在合适的培养基中低温(2～8℃)保存。不建议将样本冷冻,因为解冻时活菌将会被裂解,除非是保存在含保护剂的环境中,例如组织标本或含甘油的溶液中。土拉热弗朗西斯菌在Amies培养基中可室温存活7天[64]。目前没有对ESwabs培养基用于土拉热弗朗西斯菌运送进行专门的测试,但因为该培养基是以Amies培养基为基础,故可能是适于运送的培养基。而改良Stuart培养基和盐水不足以在运输过程中保持该菌的生存活力[64]。

对于间接检测,血清是血清学诊断各种疾病的标准标本。在感染初期尽早收集第一份血清标本,并在恢复期收集第二份血清标本(至少间隔14天,最好在症状出现后的3～4周)。血清需尽快且最好在24 h内从全血中分离出来。全血分离出来的血清标本,在2～8℃中可保存10天。若检测时间延长,需将血清冷冻保存。

六、土拉热弗朗西斯菌培养的实验室安全问题

实验室人员操作土拉热弗朗西斯菌培养物,其被感染的风险相当高。由于土拉热弗朗西斯菌致感染剂量极低,因此,土拉热成为最常报道的实验室相关细菌感染性疾病之一[65-66]。虽然生物安全柜和个人防护设备为实验室工作人员提供了安全保障,但这些预防措施不能完全消除实验室暴露[67]。目前,已有极少数土拉热弗朗西斯菌实验室获得性感染的报道[68-70]。所有怀疑土拉热弗朗西斯菌感染的患者标本需在生物安全3级实验室(biosofety leval 3,BSL3)或有3级预防措施的2级实验室内操作。实验人员应佩戴手套、呼吸防护用品,穿实验服或工作服,并在2级生物安全柜内操作。推荐采用BSL3实验室操作规范、密闭的装备和设施进行可疑培养物的所有操作,包括自动鉴定系统的菌悬液制备[71]。由于培养的细菌浓度高,实验室工作人员操作培养物时的感染风险最大,特别是在没有怀疑到土拉热弗朗西斯菌的情况下,更容易引起实验室获得性感染[67]。实验室人员在没有采取适当预防措施的情况下操作了土拉热弗朗西斯菌,可根据暴露的性质、潜伏期的长短和焦虑程度,定期测定体温或进行抗生素预防性用药,实验室暴露的更多指南可访问网站https://www.cdc.gov/tularemia/laboratoryexposure/index.html。实验室应考虑制定相关制度,并鼓励医生在怀疑土拉热时提前告知实验室。

七、直接检查

(一)显微镜检查

预期病原菌浓度高的新鲜临床标本,如溃疡和伤口拭子、组织和抽吸物等,可应用革兰染色、直接荧光抗体(DFA)结合或免疫组化(IHC)染色方法直接进行显微镜检查。革兰染色镜检标本中,弗朗西斯菌为单个的多形性菌体,其菌体细小,且与沙黄复染颜色弱,易被漏检(图48-1)。故对于土拉热弗朗西斯菌的染色,采用碱性品红作为复染剂,效果要优于沙黄染液。临床标本的革兰染色通常诊断价值有限。若革兰染色镜检发现

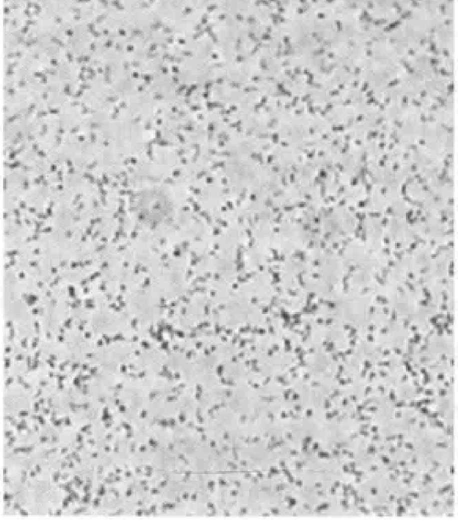


图48-1 土拉热弗朗西斯菌革兰染色,放大倍数,约×810,见彩插

细小、染色弱的革兰阴性球杆菌，应兼顾考虑土拉热弗朗西斯菌并进行鉴别诊断，土拉热弗朗西斯菌菌体比嗜血杆菌小。

(二)抗原检测

DFA染色采用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗灭活的弗朗西斯菌的超免疫兔多克隆抗体，是检测样本中土拉热弗朗西斯菌的一种快速且特异的染色方法。该DFA试剂与新凶手弗朗西斯菌和蜃楼弗朗西斯菌反应很弱甚至基本不反应。在美国，DFA检测方法可由实验室应急网络(Laboratory Response Network，LRN)中参考实验室提供。IHC染色采用抗脂多糖(LPS)的单克隆抗体，已成功地应用于福尔马林固定组织中土拉热弗朗西斯菌的检测[72]。

(三)核酸检测

由于人土拉热相对少见，难以对临床标本的分子诊断技术进行评估。基于核酸扩增试验(nucleic acid amplification test，NAAT)或基于PCR的诊断方法，常用于最易流行的溃疡腺体型土拉热的临床诊断。采用5′水解(TaqMan)探针进行的实时NAAT分析技术已用于检测多种临床标本中的土拉热弗朗西斯菌DNA，包括溃疡标本、抽吸物、咽拭子、淋巴结标本、眼拭子、支气管灌洗液和胸腔积液等[73-77]。目前，美国LRN参考实验室采用实时NAAT技术诊断土拉热。

由于新凶手弗朗西斯菌和土拉热弗朗西斯菌具有高度遗传相关性，某些基于NAAT的检测技术的局限性在于其无法将该2个种区分开来。特别是16S rRNA基因测序不能有效鉴别新凶手弗朗西斯菌和土拉热弗朗西斯菌[52,78]。尽管这对患者管理可能影响不大，但正确的菌种鉴定对于生物威胁的处理、流行病学和公共健康意义重大。

八、分离培养程序

土拉热弗朗西斯菌是生长缓慢的苛养菌，其对半胱氨酸营养缺陷，因此，需要在人工培养基中添加外源性的半胱氨酸才能更好地生长。CO_2既不妨碍生长，也非生长所必需。临床实验室的一些常用的培养基，如巧克力琼脂平板(图48-2a)、缓冲的活性炭-酵母提取物琼脂平板(BCYE)和Thayer-Martin琼脂平板等，均能支持土拉热弗朗西斯菌的生长。巯基乙酸盐肉汤能够支持土拉热弗朗西斯菌的生长，但因其增加了气溶胶暴露的风险，故不推荐临床实验室使用。参考实验室通常使用一种专门的培养基培养土拉热弗朗西斯菌，即添加9%巧克力样羊血的半胱氨酸心浸出液琼脂(cystine heart agar supplemented with 9% chocolatized sheep blood，CHAB)[57]。土拉热弗朗西斯菌在CHAB上生长良好且具有特异的菌落形态，这有助于鉴定(图48-2b)。土拉热弗朗西斯菌的生长速度缓慢(约60 min生长一代)，延长孵育时间(48 h或更长)可获得良好的生长。可疑培养物需在35～37℃有氧环境中进行培养，每日观察，长达14天。

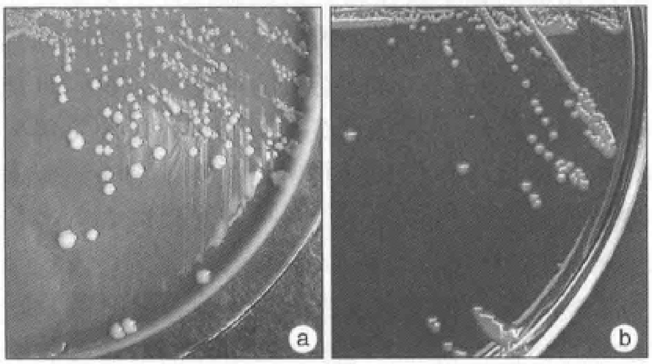


图48-2 土拉热弗朗西斯菌分别在CA(a)和CHAB(b)上生长72 h和48 h后的菌落形态[图a由CDC公众健康图像图书馆提供(Larry Stauffer，俄勒冈州立大学公众健康实验室)]，见彩插

在普通的细菌培养基(如胰胨大豆肉汤和Mueller-Hinton肉汤)中添加1%～2%的IsoVitaleX(含半胱氨酸和其他添加剂)，亦能够支持土拉热弗朗西斯菌的生长。土拉热弗朗西斯菌在缺乏L-半胱氨酸的培养基如羊血琼脂上生长不良，甚至不生长。营养丰富的标本，如血液或组织标本，因标本本身含有内源性的半胱氨酸，故初代培养时，土拉热弗朗西斯菌可能会在普通细菌培养基生长。在二次传代时，如仍采用普通细菌培养基，则营养要求苛刻的土拉热弗朗西斯菌会因为外源性营养物质的消耗而失去生长能力。

对于正常无菌部位收集的临床标本，土拉热弗朗西斯菌的培养可以接种于支持其生长的非选

择性琼脂上，但应该注意避免环境菌的实验室污染，因为这些细菌在非选择性培养基上生长迅速，可竞争性抑制土拉热弗朗西斯菌的生长[79]。从非无菌部位（如尸检）和环境中收集的标本，应接种含抗生素的选择性培养基。在土拉热弗朗西斯菌的培养基中加入抗生素混合物（7.5 mg/L 黏菌素、2.5 mg/L 两性霉素、0.5 mg/L 林可霉素、4.0 mg/L 甲氧苄啶和 10 mg/L 氨苄西林），可防止其他菌优势生长而竞争性抑制土拉热弗朗西斯菌[79]。支持土拉热弗朗西斯菌生长的含抗生素的商品化培养基包括：改良 Thayer-Martin 琼脂（Remel，Lenexa，KS），含多黏菌素 B、茴香霉素和万古霉素的 BCYE 选择性琼脂（Remel 或 BD 公司），以及含多黏菌素 B 和青霉素的半胱氨酸-心浸出液琼脂（Remel）。

培养的标本须在患者出现临床症状但未使用抗生素之前采集。新鲜的检材，如溃疡、伤口标本和淋巴样组织（肝、脾或受累的淋巴结组织），可能含有高浓度的土拉热弗朗西斯菌，可直接使用采样拭子或接种环在平板上划线接种。对于病原菌浓度低的标本，如咽洗液、支气管灌洗液和胸腔积液等，则需要较大量标本以分离该菌。全血标本可直接接种于需氧血培养瓶，并置连续监测的血培养系统进行培养[57]，血培养阳性标本后续再转种到平板上继续培养。通常，血培养瓶应孵育 5～7 天，以利于土拉热弗朗西斯菌的生长。在 30 例土拉热弗朗西斯菌菌血症的文献回顾中，约 50% 的分离培养使用了 Bactec 系统[80]。

新凶手弗朗西斯菌、蜃楼弗朗西斯菌和西班牙弗朗西斯菌，生长速度比土拉热弗朗西斯菌快，且营养要求没有土拉热弗朗西斯菌高，补充半胱氨酸可促进其生长，但半胱氨酸不是生长所必需的营养物质[2,14]。

九、鉴定

因土拉热病例稀有，且大部分散在发病，故培养的病原菌不会怀疑为土拉热弗朗西斯菌，也不易被鉴定。若培养 48 h 在巧克力平板可见 1～2 mm 灰色或灰白色菌落，而血琼脂平板和麦康凯琼脂平板上无菌落生长，染色镜检为微小的（单个菌体可能难以分辨）、沙黄复染时着色较弱的、缓慢生长的革兰阴性球杆菌（图 48-1），应怀疑为土拉热弗朗西丝菌。该菌氧化酶阴性，触酶弱阳性，β-内酰胺酶阳性，XV 因子或卫星生长试验阴性、脲酶阴性。革兰染色、氧化酶、XV 因子或卫星试验和脲酶试验有助于鉴别土拉热弗朗西斯菌和其他相似的革兰阴性菌，包括布鲁菌（*Brucella*）、流感嗜血杆菌（*Haemophilus influenzae*）、巴尔通体（*Bartonella*）、鼠疫耶尔森菌（*Yersinia pestis*）、多杀巴斯德菌（*Pasteurella multocida*）和不动杆菌（*Acinetobacter*）（表 48-1）。土拉热弗朗西斯菌最容易被误鉴定为流感嗜血杆菌，可采用 XV 因子或卫星试验进行区分。若试验结果怀疑为土拉热弗朗西斯菌，需将分离株送至参考实验室进行确认（或排除）。美国各州均有至少 1 个 LRN 参考实验室，可对细菌性生物恐怖病原体（包括土拉热弗朗西斯菌）进行确认，更多信息可访问官方网站（http://www.bt.cdc.gov/lrn）。

土拉热弗朗西斯菌在 CA、BCYE 和 Thayer-Martin 琼脂上 37℃ 培养 48 h 后，菌落大小约 1 mm，白色至灰色，光滑，不透明且边缘整齐（图 48-2a）。土拉热弗朗西斯菌在 CHAB 上生长时，其菌落形态最具特异性。37℃ 培养 48 h 后，菌落大小 1～2 mm，凸起，有光泽，外观绿色和乳白色（图 48-2b）。新凶手弗朗西斯菌和蜃楼弗朗西斯菌比土拉热弗朗西斯菌生长更好（表 48-2），蜃楼弗朗西斯菌可形成黏液性菌落。

土拉热弗朗西斯菌的鉴定可采用抗原法或分子检测方法，包括玻片凝集、DFA 染色（图 48-3）、NAAT 和测序等方法。玻片凝集法通过将可疑菌落培养物与商品化的多克隆兔抗土拉热弗朗西斯

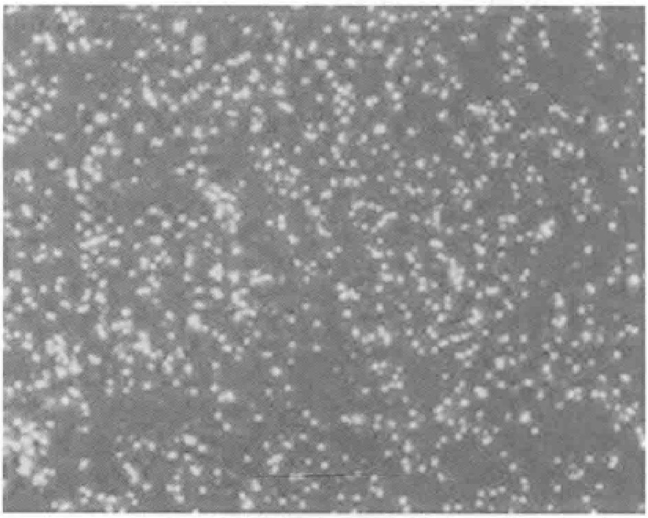


图 48-3 土拉热弗朗西斯菌培养物的 DFA 染色，放大倍数，约×490，见彩插

菌抗体(Becton,Dickinson公司)混匀,观察凝集反应以鉴定可疑菌落。DFA染色和玻片凝集试验能将新凶手弗朗西斯菌和土拉热弗朗西斯菌区分开来[57,81]。由于这2种细菌脂多糖的O抗原存在差异,因此,这些试验中使用的全灭活的土拉热弗朗西斯菌多克隆抗体与新凶手弗朗西斯菌反应差或根本不反应[57,81]。鉴于这种特异性,应优先考虑用DFA染色和玻片凝集试验鉴定土拉热弗朗西斯菌分离株。

NAAT法亦可用于可疑培养物的鉴定[74,78,82]。FDA最近批准一种基于NAAT法的高通量检测系统,用于生物恐怖病原体(包括土拉热弗朗西斯菌)的检测(http://biofiredefense.com/jbaids/),但该系统目前尚未商品化。如前文所述,NAAT试验需考虑某些土拉热弗朗西斯菌与新凶手弗朗西斯菌的交叉反应。因此,排除新凶手弗朗西斯菌或其他弗朗西斯菌菌种的感染很重要,特别是在尚未报道过土拉热的地区。采用16S rRNA基因测序和NAAT法不易将新凶手弗朗西斯菌与土拉热弗朗西斯菌区分开来,从而导致新凶手弗朗西斯菌被误鉴定为土拉热弗朗西斯菌[51-52]。16S rRNA基因测序可在将弗朗西斯菌鉴定到属水平,通过这种方法鉴定的分离株应被视为弗朗西斯菌属,并应转交给LRN参考实验室进行土拉热弗朗西斯菌的特异性检测。

对于土拉热弗朗西斯菌的鉴定,不建议临床实验室采用商品化的生化和脂肪酸鉴定系统,因为这些操作可能会导致错误鉴定,且有产生感染性气溶胶的潜在风险[57]。在美国的哨点级实验室,土拉热弗朗西斯菌可能会被误鉴定为流感嗜血杆菌和凝聚杆菌(https://www.asm.org/index.php/guidelines/sentinel-guidelines),误鉴定主要是由于土拉热弗朗西斯菌生化反应不活泼,其生长缓慢及数据库开发中使用的菌株数量有限。采用这些鉴定系统,新凶手弗朗西斯菌和西班牙弗朗西斯菌也有被错误鉴定为土拉热弗朗西斯菌的报道[14,51]。除此之外,其他的微生物,如韦荣菌属(*Veillonella*)和某些假单胞菌属菌种(*Pseudomonas* spp.)也会被这些鉴定系统误鉴定为土拉热弗朗西斯菌,导致不必要的生物安全防护和生物安全安保考虑[83-84]。

在研究和参考试验室,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术已经用于弗朗西斯菌株的鉴定和区分[85-88]。然而,与生化系统一样,弗朗西斯菌不在当前的商业数据库中,故临床实验室使用MALDI-TOF MS可能会导致错误鉴定或无鉴定结果[88]。Bruker Biotyper质谱仪经特别安全许可,其数据库包含土拉热弗朗西斯菌,可用于体外诊断,但该数据库仍需要自配补充试验,以获得细菌种水平的鉴定[86,89]。对于bioMérieux Vitek MS系统,仅在供科研使用的数据库中含有土拉热弗朗西斯菌。因此,MALDI-TOF MS技术有望成为今后鉴别土拉热弗朗西斯菌的方法,但目前应用有限。而在MALDI-TOF MS分析的样品制备过程中,也必须考虑到安全因素,应采用乙醇-甲酸管提取程序,因为该法比直接菌落法或直接涂板的甲酸提取法能更可靠地灭活土拉热弗朗西斯菌和其他生物恐怖菌[88,90]。

自动化系统(如生化系统、脂肪酸系统和MALDI-TOF MS系统)可能出现的错误鉴定包括:低概率或置信度值和(或)病原菌的鉴定与临床或微生物学特征不一致。临床实验室应严格分析自动化鉴定系统的鉴定结果,采用自动化鉴定系统鉴定慢生长和(或)罕见细菌时,应综合其革兰染色特性、菌落形态、生长速度和培养条件方面的特征对鉴定结果的可靠性进行判断。临床微生物学家是否能够高度怀疑到土拉热弗朗西斯菌,对于土拉热的及时、准确诊断至关重要。

十、分型系统

一旦分离株鉴定为弗朗西斯菌,则需要补充试验来确定其他特征,包括在种、亚种和菌株水平上的分型。甘油发酵试验和瓜氨酸酰脲酶活性可区分土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种和土拉热弗朗西斯菌全北极亚种(表48-2)。NAAT法(普通PCR和实时荧光定量PCR、失配扩增分析的熔点分析和脉冲场凝胶电泳)可在属、种、亚种(如土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种和全北极亚种)和亚群(土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种A1亚群和A2亚群)等水平上对分离株进行分型[57,91-92]。全基因组多位点序列分型显示出更高的分辨率,并且随着测序技术变得更加容易获得,该技术很可能在未来得到更广泛的应用[93]。

十一、血清学试验

土拉热的确证诊断需基于血清学方法，即患者恢复期的血清特异性抗体滴度较急性期是否有4倍以上的升高[57]。血清学试验不能区分土拉热弗朗西斯菌土拉热亚种和土拉热弗朗西斯菌全北极亚种。对于未接种土拉热疫苗的患者，单个抗体滴度阳性可推定诊断为土拉热。由于土拉热弗朗西斯菌感染后需10～20天才能产生抗体反应，故血清学试验在急性感染患者临床管理方面的应用受到了限制。土拉热可同时产生IgM、IgA和IgG 3种抗体，抗体持续时间可达10年以上[58,94-95]。IgM抗体的反应持续时间较长，不可作为早期或近期感染的指标[94,96]。

通过试管凝集法或微孔凝集法进行的凝集试验是一种标准血清学试验，可用于确定患者是否存在土拉热抗体[57]。福尔马林灭活抗原可通过商业购买，也在全球的参考实验室中制备。单一标本试管凝集法抗体滴度≥1∶160或微孔凝集法抗体滴度≥1∶128时，结果判定为阳性。福尔马林灭活的土拉热弗朗西斯菌全菌体抗原与布鲁菌病抗体有低水平的交叉反应[97-98]，但未观察到新凶手弗朗西斯菌和蜃楼弗朗西斯菌抗血清与土拉热弗朗西斯菌灭活菌体有交叉反应[9]。酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assays，ELISAs)法也可以用于土拉热的血清学诊断[57,94,99-100]，且脂多糖和(或)外膜成分仍是ELISA法使用的主要抗原。

十二、抗菌药物敏感性

土拉热弗朗西斯菌的感染可应用抗生素治疗。目前，所有自然存在的土拉热弗朗西斯菌分离株对氨基糖苷类、四环素类和氟喹诺酮类药物敏感[57,58,101-102]。链霉素是治疗的首选药物，庆大霉素被认为是可接受的替代药物。对于病情较轻的患者，四环素类药物可能是合适的替代药物。氟喹诺酮类药物没有被美国FDA批准用于治疗土拉热，但是在体外及在动物和人类中显示出良好的疗效。土拉热弗朗西斯菌在治疗过程中发展为耐药的风险很低，而土拉热是一种终末宿主疾病，不会在人与人之间传播[57]。土拉热患者的治疗失败与症状起始的抗生素治疗延迟有关，而并非耐药的发展[73,103-104]。土拉热弗朗西斯菌引起的淋巴结化脓对所有抗生素治疗均无效，需手术引流，且该类患者的康复时间会更长，甚至超过70天[104]。

由于土拉热弗朗西斯菌产生A类β-内酰胺酶FTU-1，故β-内酰胺类抗生素不用于治疗土拉热[105]。β-内酰胺酶介导的耐药性仅局限于青霉素类，体外MIC数据表明FTU-1不介导对其他β-内酰胺类药物的耐药性，包括第一代和第二代头孢菌素类[105]。尽管体外试验显示第三代头孢菌素对土拉热弗朗西斯菌有活性，但临床试验表明头孢曲松治疗土拉热无效[106]。大环内酯类药物也不推荐用于土拉热的治疗，这是因为来自中欧、东欧和亚洲的土拉热弗朗西斯菌全北极亚种菌株对红霉素和其他大环内酯类药物存在天然耐药[107]。

临床实验室不开展土拉热弗朗西斯菌的药敏试验，这是由于两方面原因：生物安全的考虑和用于治疗土拉热的抗生素从未有耐药的报道[58]。临床和实验室标准化协会(CLSI)出版了该菌微量稀释法药敏试验的解释标准和质量控制范围，使用培养基为添加2%生长添加剂的MH肉汤[108]。

十三、结果的评估、解释和报告

临床分离培养出生长缓慢的极细小的革兰阴性苛养菌，氧化酶阴性、触酶弱阳性、脲酶阴性、Ⅹ/Ⅴ因子或卫星试验阴性、β-内酰胺酶阳性，应高度怀疑土拉热弗朗西斯菌并提交参考实验室(美国的LRN参考实验室)[57]。土拉热弗朗西斯菌感染的确认试验包括：①培养物鉴定为土拉热弗朗西斯菌；②急性期和恢复期血清标本的抗体滴度呈4倍的差异，且两份标本中一份抗体滴度呈阳性。采用抗原或分子检测法(包括DFA染色、IHC染色、NAAT等)检测临床标本时，阳性结果仅提示土拉热弗朗西斯菌感染的推测性诊断；单一血清标本阳性也是推测性诊断。分离培养可对感染做出结论性诊断，但应采用适当的生物安全防护措施。鉴于土拉热弗朗西斯菌生长缓慢且营养要求高，血清学试验成为实验室确诊的最常用方法。必须考虑患者的症状，以确保土拉热的实

验室诊断与临床情况相符合。任何通过 NAAT 或自动化系统(包括生化鉴定系统、脂肪酸鉴定系统或 MALDI-TOF MS 鉴定系统)鉴定的弗朗西斯菌属细菌都应提交给参考实验室(美国的 LRN 参考实验室),进行土拉热弗朗西斯菌的特定检测。

在美国,土拉热是一种国家法定报告疾病,土拉热弗朗西斯菌被列为生物恐怖性病原体。生物恐怖性病原体的鉴定需要进行病原菌的分离培养和确证,实验室鉴定为土拉热弗朗西斯菌后,必须在 24 h 内上报生物恐怖性程序(Select Agent Program)网络,并需在 7 天内完成表格 4 的填写,提交给生物恐怖性程序网络。报告格式、联系信息、实验室注册信息,以及美国联邦法典的相关引用可访问网站:http://www.selectagents.gov。在大多数欧洲国家,土拉热也是一种法定报告疾病,相关信息由欧洲疾病预防控制中心收集[32,42]。

其他弗朗西斯菌属细菌,特别是新凶手弗朗西斯菌,实验室检测时可能与土拉热弗朗西斯菌相混淆。由于这些细菌罕见且与土拉热弗朗西斯菌相似,对其诊断具有挑战性。如果实验室怀疑检测到弗朗西斯菌属细菌,建议临床实验室向参考实验室进行咨询。

参考文献请扫二维码查阅

第49章　布鲁菌属

GEORGE F. ARAJ

（邹明祥　译；王倩、王辉　审校）

布鲁菌属（*Brucella* spp.）是引起家畜和野生动物（包括海洋哺乳动物的新物种）感染的动物疫源性疾病常见病原体。布鲁菌属也可以引起人的感染，其症状与其他感染性疾病和非感染性疾病的症状相似，因而对医生明确诊断带来了挑战。布鲁菌病（brucellosis）的弛张热或波浪热，其发热初期易与疟疾、伤寒等其他发热疾病相混淆；并且，布鲁菌病的弛张热或波浪热有多个别名，如地中海热、马耳他热、直布罗陀热和塞浦路斯热[1-2]，它们的命名主要源于疾病发生的地点。过去的十年里，布鲁菌被大部分权威机构收录为潜在生化武器细菌，故重新受到关注[3-4]。

一、分类学

布鲁菌科（Brucellaceae）是一类与系统发生关系密切、营自生生活的土壤微生物，包括布鲁菌属、苍白杆菌属（*Ochrobactrum*）和枝动杆菌属（*Mycoplana*）。布鲁菌科隶属于根瘤菌目（Rhizobiales），该菌目也包括其他一些可引起人类疾病的菌属，如巴尔通体属（*Bartonella*）、阿菲波菌属（*Afipia*）、甲基杆菌属（*Methylobacterium*）和玫瑰单胞菌属（*Roseomonas*）[5-6]。

布鲁菌的分类学尚有待于进一步明确。研究表明，陆生的布鲁菌之间高度同源，具有>90%的DNA-DNA杂交的种间同源性、完全一致的16S rRNA基因序列，以及比较基因组学>98%的序列同源性。故根据这些研究，有学者建议将布鲁菌列为一个单种的属，属内其他种应该归类为马耳他布鲁菌（*Brucella melitensis*）的生物变种[7]。

布鲁菌基因组平均大小是 2.37×10^9 Da，DNA的G+C含量是58～59 mol%。目前，布鲁菌属包括10个已确认的种（8个陆生菌种，2个海洋菌种）和1个最近提议的从乳房植入体分离的来源不明的新种——意外布鲁菌（*Brucella inopinata*）[8-11]。

这8个陆生布鲁菌种分别是：马耳他布鲁菌（*B. melitensis*）（含3个生物变种，首选宿主是山羊、绵羊和骆驼）、流产布鲁菌（*B. abortus*）（含7个生物变种，宿主包括家牛和水牛）、猪布鲁菌（*B. suis*）（含5个生物变种，宿主为猪和多种野生动物）、犬布鲁菌（*B. canis*）（宿主为狗）、绵羊布鲁菌（*B. ovis*）（宿主为公羊）、沙林鼠布鲁菌（*B. neotomae*）（宿主为沙漠鼠和林鼠）、田鼠布鲁菌（*B. microti*）（宿主为赤狐）和狒狒布鲁菌（*B. papionis*）（宿主为狒狒和牛蛙）。2个海洋菌种包括鳍脚布鲁菌（*B. pinnipedialis*）和鲸种布鲁菌（*B. ceti*），是从海洋哺乳动物（如海豹、鲸鱼和海豚）中发现的，其与6个（译者注：此处应为8，原文为6）陆生菌种之间的表型差异在于底物介导的代谢活性谱有所不同。需注意的是，尽管布鲁菌存在首选宿主或主要宿主，但仍会与包括人类在内的其他哺乳动物发生交叉感染[2,12]。

二、属的描述

布鲁菌是兼性胞内寄生的革兰阴性球杆菌，其菌体微小（0.5～1.5 μm），无荚膜，无鞭毛，无芽胞且无天然质粒。该菌为需氧菌（有些菌的生长喜好 CO_2），不发酵糖类，但能以氧化代谢的方法分解一些糖类；能够在多种培养基上生长，24～48 h形成肉眼可见的菌落，且大部分为光滑型菌落，但存在粗糙型菌落变异[12-13]。

三、抗原组成

布鲁菌存在多个抗原决定簇，这些抗原决定簇主要与脂多糖(lipopolysaccharide，LPS)和蛋白质抗原相关。LPS是与抗体发生免疫应答的主要抗原。粗糙型菌株和光滑型菌株的LPS非常相似。基于O侧链，光滑型菌株由两个抗原表位组成：A(源于*B. abortus*种名的第一个字母A)和M(源于*B. melitensis*种名的第一个字母M)。据报道，在抗原凝集反应和补体结合试验中观察到：布鲁菌光滑型菌株的LPS与小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)O:9、赫氏埃希菌(*Escherichia hermannii*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)O:157、肠沙门菌(*Salmonella enterica*)O:30血清型、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)O:1和土拉热弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)等病原体存在交叉反应。而交叉反应发生的原因在于，这些微生物LPS分子具有类似的O特异性侧链[2,12,14]。

特异性蛋白质抗原包括外膜、内膜、细胞质和周质抗原，其中有些抗原在感染中可被免疫系统识别，基于抗原成分的诊断试验具有潜在的应用价值[15]。例如，Omp25是一种外膜结构蛋白，在所有布鲁菌中高度保守，并且与LPS和肽聚糖相关。此外，某些蛋白质，如核糖体蛋白(如L7/L12)和融合蛋白，通过抗体和细胞介导的免疫反应，对布鲁菌的感染具有保护作用[16]。这些分子有助于研究有潜力的疫苗。

四、毒力因子、致病机制和免疫反应

布鲁菌感染的确切病理生理机制有待明确，特别是这种“隐性病原体”可在人体中感染和存活，但不引起严重的炎症反应[17-21]。病原体在胞内的位置和存活能力，与病原体的毒力和致病机制有关。布鲁菌毒力因子包括脲酶和含布鲁菌的囊泡(*Brucella*-containing vacuole，BCV)，其中脲酶可以在细菌通过口腔通道时逃避胃酸的杀菌作用，而BCV可使细菌逃脱免疫系统的识别，并提供一个酸性环境破坏抗生素的活性。布鲁菌LPS细胞成分(含聚*N*-甲酰过胺O链和铜锌超氧化物歧化酶)和外膜蛋白25(OMP25)有助于细菌在单核吞噬细胞内存活。另外，布鲁菌LPS诱导γ干扰素和肿瘤坏死因子α(TNF-α)的能力较弱，而这两种细胞因子在Th1型细胞介导的清除病原菌的免疫反应中必不可少[20-22]。

一旦布鲁菌通过各种途径侵入机体，可被多形核和单核吞噬细胞识别，凝集素促进病原菌附着于这两种细胞，脂质筏(lipid rafts)有助于病原菌逃避机体的防御机制。布鲁菌进入细胞后，第一步需要建立一个在胞内复制的小生境(niche)；在这一步中，布鲁菌的LPS和胞质循环中的β-葡聚糖的作用至关重要。布鲁菌通过抑制吞噬体-溶酶体的融合来逃脱吞噬细胞的杀伤，并借此逃避免疫系统的作用。这些毒力因子和含布鲁菌的囊泡有助于病原菌在吞噬细胞和其他细胞中存活、繁殖和持续存在。因布鲁菌寄生在巨噬细胞中，其可以通过局部淋巴结转运至循环系统，进而通过网状内皮系统的趋向性散播到全身，导致疾病的不同临床阶段[18]。

整个炎性过程导致多形核白细胞对布鲁菌细胞壁成分的缓慢降解，并可以形成肉芽肿。相对于马耳他布鲁菌，肉芽肿的形成多与流产布鲁菌相关[18]。

通过蛋白质抗原的激活，机体产生LPS抗体和T细胞介导的巨噬细胞活化等保护性免疫反应。此免疫反应持续时间不长。淋巴细胞是免疫应答的主要刺激目标，其中辅助性T淋巴细胞1(Th1)型淋巴细胞免疫反应刺激产生IgG2a，而IgG2a通过细胞介导免疫参与了主要的抗胞内病原菌保护反应，这对清除布鲁菌感染非常重要。Th2型淋巴细胞免疫反应刺激IgG1的产生，IgG1则通过体液免疫反应参与主要的抗胞外病原菌保护反应[23]。

近期研究表明，在布鲁菌性关节炎和骨髓炎中，细胞因子、趋化因子和基质金属蛋白酶的产生与诱导性破骨细胞的生成有关；OMP 19脂蛋白和肿瘤坏死因子α则与神经型布鲁菌病中星形胶质细胞的凋亡有关[23]。虽然备受关注，但免疫反应的确切本质和疾病相关的保护性抗原/因子仍在研究当中，且再感染的发病机制尚不清楚[24]。

五、流行病学和传播

一般来说，动物是布鲁菌的无症状携带者。布鲁菌感染的主要症状表现为动物胎盘和胎儿的感染性流产。感染胎儿每克组织和体液中可高达 10^{10} 个细菌[12]。尽管巴氏消毒法、紫外照射、酸液、多种防腐剂和消毒剂可杀死布鲁菌，但它能够在多种环境中存活很长的一段时间，如在土壤中可存活 10 周，在流产胎儿中可存活 11 周，在牛粪便中可存活 17 周，在牛奶和冰淇淋中约存活 3 周，在新鲜羊奶酪中可存活数月[12,25]。布鲁菌可感染人和动物。在人类感染的所有病例中，马耳他布鲁菌在世界范围内占主要地位(特别是地中海和阿拉伯海湾国家)。然而，在欧洲某些地方，流产布鲁菌和猪布鲁菌的流行率超过了马耳他布鲁菌。据报道，犬布鲁菌也可导致人类疾病，然而尚无绵羊布鲁菌和沙林鼠布鲁菌致人发病的报道[12,26-28]。文献报道海洋动物相关的布鲁菌可导致人类疾病[2,29-30]。在流行区和非流行区，人布鲁菌病的流行随年龄、性别、季节和危险因素等的不同而存在差异。在流行地区，如地中海盆地东部、中东地区、阿拉伯半岛、墨西哥、中美洲和南美洲、南欧、中亚及印度次大陆，疾病发生在普通人群中。在这些人群中，不同性别的成年人和儿童的感染水平基本一样，这主要与食用了未经高温消毒的山羊、绵羊、牛和骆驼奶及其制品(如软奶酪、冰淇淋)有关[26-27,31-34]。

在非流行区域，布鲁菌感染主要发生在成年男性，且感染与职业有关，如与感染动物组织的皮肤直接接触(例如，通过伤口和擦伤)、吸入含感染性颗粒的气溶胶、意外接种(如飞沫或气溶胶接种到眼、口和鼻)等。这些感染大多发生在乳制品行业人员、兽医、屠宰场工人、临床和微生物学研究人员中[2,28]。

人与人的传播有可能发生，但非常罕见。目前，共有 45 例报道。多数病例(61%)归因于新生儿母婴传播和母乳喂养。其他原因包括性传播、输血和骨髓移植[35]。

实验室获得性感染是传播的重要来源。布鲁菌感染剂量很低($\leqslant 10^2$ 个病原菌)，临床和科研实验室在处理含有布鲁菌的培养物时，工作人员应遵循严格的安全防护措施[36-38]。

大多数实验室获得性感染的病例是因对病原体的操作不当和错误鉴定导致的[38]。从实验室安全和作为潜在生物武器的角度来分析，临床实验室常不能正确鉴定布鲁菌分离株是一件特别令人担忧的事。目前，马耳他布鲁菌、流产布鲁菌和猪布鲁菌被归类为生物危害第二类病原微生物[4,17]。

六、人布鲁菌病的临床分类

人布鲁菌病的临床分类尚无严格的标准。1956 年，Spink 以症状的持续时间来分类(急性，<2 个月；亚急性，2～12 个月；慢性，>12 个月)[39]。随后，逐步形成了其他一些基于临床表现的分类方法(如亚临床、局部、慢性和急性，有或无局部疾病，包括菌血症和血清学分类)[27,40]，但至今尚无统一的定义可以采用。

布鲁菌病的潜伏期长短不一，但一般为 1～4 周。布鲁菌病起病隐匿，可表现出广泛多样的非特异性临床症状和体征，如发热、盗汗、关节痛、肌痛、乏力、食欲缺乏、体重减轻和肝脾大等。并发症可涉及多个器官和组织，可有局部病灶。常规血液学和生化指标一般在正常范围内，血沉和肝功能指标升高。因此，如果临床医生没有意识到布鲁菌感染，则布鲁菌病的诊断非常困难，可能会延误数周，甚至在一些复杂的病例可延误数年难以明确诊断[26,31,41-44]。

对于布鲁菌病低发地区而言，前往流行区域休闲旅游和商业往来的增加，将会给疾病的诊断，尤其是症状不典型时的疾病诊断带来挑战。来自中东叙利亚战争地区的西欧移民也会遇到这种情况[27,45]。总的来说，布鲁菌病病死率低但发病率高。儿童布鲁菌病以前认为并不常见，但现在似乎一样流行，其流行方式和临床症状与流行地区的成人类似[32-33,46]。

人布鲁菌病缺乏特异性的临床表现，其与多种疾病的临床症状相似，因此，它被贴上了“易误诊疾病”的标签。容易与布鲁菌病混淆或误诊的其他疾病包括：伤寒、风湿热、结核病、疟疾、传染性单核细胞增多症、心内膜炎、组织胞浆菌病、强直性脊柱炎、胆囊炎、血栓性静脉炎、胶原血管疾病、自身免疫病和肿瘤等[22,26,41]。

七、并发症

布鲁菌病最常见的局灶性并发症包括：骨关节（10%～70%，主要在关节）、男性生殖器（6%～8%）、女性生殖器（2%～5%）、神经系统（3%～5%）、心脏（1%～3%）、肺部（1%～2%）和肾（<1%）。局灶性并发症的病死率很低（<1%），几乎都是由心脏并发症引起的[26,40-42,47-49]。

骨关节并发症主要是关节炎（10%～70%），脊髓炎少见（<1%）。按从高到低的排列顺序，布鲁菌病最常受累的关节依次是：骶髂关节、膝关节、髋关节、脊椎、脚踝及其他多个关节。布鲁菌关节炎常被误诊为类风湿关节炎、风湿热、结核病和系统性红斑狼疮等疾病[50-51]。

神经型布鲁菌病（占病例的3%～5%）可发生在成人和儿童中，且有不同的症状，包括发热、头痛、脑膜刺激征、昏迷、局部麻痹。抑郁、精神病和心理疲劳是常见的主诉[52-56]。成人与儿童的脑脊液（CSF）分析都是非特异性的，其结果与其他中枢神经系统疾病（如结核分枝杆菌感染、病毒感染、梅毒感染或真菌感染）或非感染性疾病（如精神疾病、多发性硬化和癌症）的结果重叠[52]。CSF的布鲁菌培养阳性率低（5%～30%），故CSF标本采用布鲁菌血清学试验，特别是间接Coombs试验、布鲁菌捕获试验（Brucellacapt）或酶联免疫吸附试验（ELISA）等，对于神经型布鲁菌病的诊断非常重要[54,57-58]。经过适当治疗，急性布鲁菌病预后较好，而慢性布鲁菌病预后则各不相同。男性生殖系统并发症（占病例的6%～8%）大部分表现为睾丸炎或附睾睾丸炎[26,42]。女性生殖系统并发症包括流产、宫颈炎、输卵管炎、输卵管卵巢脓肿和卵巢皮样囊肿等，但很罕见[26,42,59]。

复发是布鲁菌病及其并发症最重要的特征之一，与复发相关的确切因素仍不明确，但有些学者指出需注意以下因素：使用低效抗生素治疗、起始发病期血培养阳性、起始治疗前有≤10天的症状持续期[26,43,60-61]。

八、标本的采集、处理、保存和运送

布鲁菌病标本的实验室检测方法包括细菌培养、血清学试验和（或）分子检测。可用于培养的标本类型广泛，包括血液（至少2套）、骨髓、脑脊液、胸膜液和滑膜液、尿、脓肿标本和组织标本等。在抗生素治疗前需保证采取足够量的标本。

血清和相关的脑脊液标本可用于血清学试验。虽然分子检测手段常用于科研，但此方法可以检测血液（包括血清或全血）、脑脊液和骨髓标本。

正确的标本采集、处理、运送和操作指南，通常与已报道的血培养及其他细菌培养的操作指南相似（第19章）。

若预期标本会延迟送达实验室，则应将其置于冰箱中保存。为避免或降低实验室暴露，疑似布鲁菌病患者的标本应做适当的标记，在标签上标明“实验室应排除布鲁菌病”[62]。

九、直接检测

为规避常规培养和血清学诊断在人布鲁菌病诊断中的局限性，实验室可采用自建的普通PCR和逆转录PCR（RT-PCR）直接检测临床标本中的布鲁菌。目前多个布鲁菌特异性的靶基因已开始用于PCR的检测，包括BCS P31（编码31 kDa的细胞表面蛋白）、BP26（编码26 kDa的胞质蛋白）、16S rRNA基因和插入序列*IS711*。这些检测方法敏感性存在差异，变化范围在50%～100%。这种差异可能和不同的DNA提取方法、检测模式及标本类型有关。核糖体16S～23S ITS区间是一适宜的靶基因，可用于检测临床标本（包括福尔马林固定、石蜡包埋的存档组织标本），也可以用于将培养后的分离株鉴定到种的水平[58,63-67]。

在临床实验室，分子检测方法是一种有用的辅助技术，对人布鲁菌病的诊断具有潜在的应用前景，但它们在人布鲁菌病（如原发性感染、治疗后随访监督、复发的早期检测及局灶性并发症的诊断等）诊断中的常规应用尚需进一步的优化和标准化[66]。

十、培养

培养是布鲁菌病实验室诊断的“金标准”，而且分离菌株对流行病学调查和药敏试验也有帮

助。常规方法需要较长的孵育时间(6 周),且培养阳性率差别大,急性布鲁菌病(培养阳性率为 40%~90%)高于慢性、局灶性和病情复杂的布鲁菌病(培养阳性率为 5%~20%)[36,58,63]。培养的阳性结果可为疾病提供明确的诊断。骨髓培养比外周血培养阳性率高 15%~20%。对于非自动化的血培养,经典的标准培养基是双相 Ruiz-Castañeda 瓶,其培养阳性时间为 7~35 天,一般需持续培养 6 周,每 3 天肉眼观察一次,且最终的阴性标本在丢弃之前需进行盲传。

自动连续监测血培养系统,如 Bactec (BD Diagnostics,Sparks,MD) 和 BacT/Alert (bioMérieux,Durham,NC),比传统培养方法的阳性率高,且能更快地监测到细菌生长(大部分细菌在 1 周内),故没有必要将培养瓶孵育超过 10~14 天[36,63]。裂解离心系统相对于非自动血培养系统,能缩短培养时间和增加培养阳性率。但因接种前需要离心和处理,故存在暴露和污染的风险。有些布鲁菌病患者会出现血培养阳性而血清学试验阴性,但这种情况非常罕见[36]。

除血标本外,其他临床标本如骨髓、脑脊液、关节液、组织匀浆和骨骼,在进行布鲁菌的分离培养时,可在血平板和巧克力平板划线接种的同时,接种肉汤培养基(如血培养所用的肉汤)进行增菌。划线接种的培养基需在 37℃、5%~10% CO_2 中孵育 10 天,若仍无菌生长,则报道为阴性[63-64]。

十一、鉴定

临床微生物实验室可根据形态学、生化反应和血清学试验对布鲁菌属的可疑菌落进行鉴定。布鲁菌培养物的所有操作均需在生物安全柜中进行。血平板(图 49-1a)和巧克力平板上培养的菌落,通常来自直接接种的临床标本或肉汤培养基的传代培养(如有生长信号的血培养)。菌落也可在其他培养基上生长,如 MH 平板(图 49-1b)和麦康凯平板(生长情况有差别)。Thayer-Martin 或 Martin-Lewis 培养基可用于含杂菌标本的布鲁菌的分离。一般情况下,37℃ 需氧或 5%~10% CO_2 环境中孵育 24~48 h 可见菌落生长,当培养为阴性时,没必要将平板培养超过 72~96 h。布鲁菌的菌落直径为 1~2 mm,边缘整齐,光滑,有光泽,其中犬布鲁菌可有粗糙型菌落变异。布鲁菌属细菌为革兰阴性小球杆菌(直径 0.5~0.7 μm,长度 0.6~1.5 μm)(图 49-2),生化反应:氧化酶阳性,触酶阳性,脲酶阳性,与特异性流产布鲁菌和(或)马耳他布鲁菌抗血清的玻片凝集反应为阳性[12-13]。

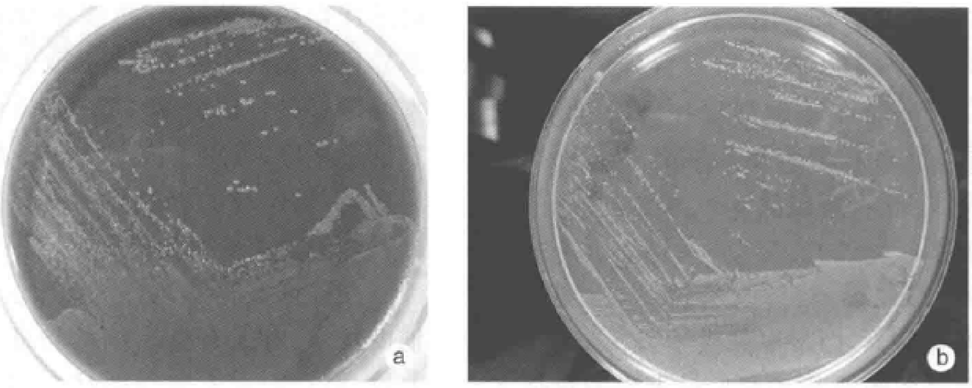


图 49-1 马耳他布鲁菌在血平板(a)和 MH 平板(b)上培养 48 h 后的菌落形态,见彩插

临床实验室一旦完成上述试验的检测(译者注:对于符合上述特征的分离株),即可初步报道布鲁菌属。进一步的特征描述和菌种鉴定还需更多的试验,而这些试验项目在大部分临床实验室没有常规开展[13-14]。在美国,实验室应急网络参考实验室能进行布鲁菌的确认和菌种鉴定,并且提供指导和其他相关信息,详见网站:http://emergency.cdc.gov/lrn/biological.asp.

常规方法和分子特征(基于 DNA 靶序列的测序法)有助于明确鉴定布鲁菌。对布鲁菌属种水平的常规分类和鉴定,可以根据某些反应的结果来确定,如染料抑制(硫堇、品红、沙黄)、CO_2 需

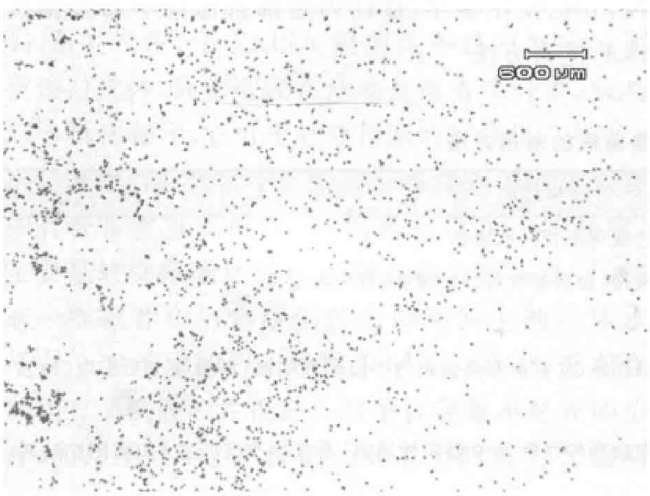


图 49-2 马耳他布鲁菌革兰染色，见彩插

求、第比利斯噬菌体裂解试验、氧化代谢试验（谷氨酸、鸟氨酸、核糖和赖氨酸），以及对单价特异性血清的反应等。分子方法，如多位点酶电泳、脉冲场凝胶电泳、随机扩增多态性 DNA 分析、肠杆菌重复基因间共有序列 PCR 法、重复基因间回文序列 PCR 法、扩增片段长度多态性分析、单位点序列分析（如 *omp2a* 和 *omp2b*）和多位点序列分析等，可将布鲁菌鉴定到生物亚种[11,68]。多重 PCR 芯片分析法也成功用于布鲁菌属的检测和鉴别[69]。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）能将布鲁菌鉴定到属水平，只要相关信息包含于其使用的数据库中（如 Bruker 生物安全相关文库）[70-71]。快速、可靠的鉴定方法不仅对临床诊断非常重要，在传染源的流行病学调查和疾病预后方面也具有十分重要的作用，如大部分严重的布鲁菌病是由马耳他布鲁菌引起的。

十二、分型系统

对于单一型菌种分离株的流行病学分型而言，多位点可变数目串联重复序列分析（multilocus variable-number tandem-repeat analysis，MLVA）是分辨率最高的方法之一。在布鲁菌中，将分布在布鲁菌基因组中的重复标志性位点结合起来的、基于 21 个位点的 MLVA-21 体系和基于 16 个位点的 MLVA-16 体系，可区分时间和地域分布广泛的布鲁菌属的分离株，或起源接近的布鲁菌属的分离株[11,68]。布鲁菌的 MLVA 数据库可访问 http://mlva.u-psud.fr/brucella/，该数据库含有 500 株以上的人类和动物的布鲁菌分离株数据。分子亚型分型方法，特别是前景广泛的 MLVA，不仅可应用于流行病学回顾性溯源及暴发调查，还可用于区分复发与再感染，并进而影响临床治疗决策。其他方法，如基于单核苷酸多态性的基因芯片技术和基因测序，也可得到高分辨的分型结果[10,72-73]。

十三、血清学试验

血清学试验是布鲁菌病实验室诊断最常用的检测方法[58,63-64]。血清学试验结果的最佳解释应结合机体感染布鲁菌后抗体反应的变化情况。布鲁菌感染的过程中，首先出现 IgM 抗体，接下来的 10～14 天内出现 IgG 抗体。这些抗体和其他免疫球蛋白随机体对治疗的反应而变化；随着病情恢复，可观察到抗体滴度逐步缓慢地下降，若滴度持续性存在则提示治疗反应不佳，可能存在局灶性并发症、慢性感染或复发[74-76]。研究发现，在 15%～20%正在治疗和痊愈的无症状患者中，抗体持续存在［例如，在很长时间内（数月甚至数年）检测到抗体，主要是 IgG 和一些 IgM］。目前尚无法解释此现象[26]。

血清学试验使用的几种抗原，通常来自马耳他布鲁菌和流产布鲁菌。全细胞抗原常用于凝集反应和间接免疫荧光（IFA）试验，而超声提取物、纯化 LPS 或布鲁菌的蛋白质提取物主要用于 ELISA 试验[13,63]。检测针对犬布鲁菌和绵羊布鲁菌的抗体，需要使用主要的外膜蛋白抗原，这是由于这些菌株是以粗糙型菌落形式存在，它们和其他布鲁菌种之间不存在交叉抗原[77]。由于没有标准化的参考抗原，无论是商品化来源还是其他来源的抗原都可能影响试验结果[63]。

大量实验室自建的血清学试验方法已用于布鲁菌病患者的调查研究（表 49-1）。这些试验方法包括试管直接凝集试验［如血清凝集试验（serum agglutination test，SAT）］、玻片凝集试验［如玫瑰红试验（rose Bengal test）］、间接 Coombs 试验、布鲁菌捕获试验（Brucellacapt test）、IFA 和 ELISA，以检测免疫球蛋白类型和亚类[63]。通常情况下，凝集试验无法区分抗体类型，酶免疫测定（EIA）和

IFA 则可以区分抗体类型。商品化的检测布鲁菌 IgG 和 IgM 的 EIA 法具有较高的敏感性和特异性，并已使用多年，被认为是筛查血清中布鲁菌抗体的优秀方法[63]。

表 49-1 实验室诊断布鲁菌病的常用方法

试验方法	概述
直接镜检	敏感性低；非常规使用方法；用于差异性染色或免疫特异性染色
培养	培养阳性可明确诊断；阳性率差异大；生长缓慢；血培养仪可加快速度；有生物危害
血清学试验	最常用的诊断方法
玻片凝集法	简单；快速(10 min)；在急性病例中使用相对较好；在复杂和慢性病例中假阴性率高；易发生交叉反应(如假阳性)
试管(SAT)或微孔凝集法	广泛使用；在急性病例中使用相对较好；在复杂和慢性病例中假阴性率高；易发生交叉反应(如假阳性)；耗时，需 24 h 后判读结果
间接 Coombs 试验	SAT 法的延伸；另需 24 h 来判读结果；检测非凝集或不完全抗体；复杂和慢性病例使用较好；相比 ELISA，漏诊约 7%的病例
布鲁菌捕获试验	基于免疫捕获技术，一步法检测非凝集的 IgG 和 IgA 抗体及凝集抗体；操作与 Coombs 试验类似，但更快，更易于操作
ELISA	复杂和慢性病例可选的方法；当其他试验阴性时，可检测总的和各种特异性免疫球蛋白(IgG、IgM、IgA)；快速(4～6 h)；客观；敏感性和特异性高
IFA	类似于 ELISA，但更主观且无法检测 IgA；快速(2～3 h)
分子 PCR，逆转录 PCR	有前景的方法，理论上敏感性和特异性高；相比于培养和血清学试验，在临床实验室常规使用前需进行额外的备案

布鲁菌捕获试验(Vircell，Granada，Spain)是一种简便、快速(18～24 h)、基于免疫捕获凝集原理的血清学试验，可一步法检测非凝集的 IgG 和 IgA 抗体，在疾病活动的随访中似乎很有用，其敏感性和特异性与 Coombs 试验类似。由于 Coombs 试验比较烦琐，有多个洗涤步骤和离心操作，出报告时间长(48 h)，因而布鲁菌捕获试验是一种有价值的替代方法，并有助于患者的随访[78]。侧向免疫层析试纸试验提倡用于流行区布鲁菌病患者的筛查或监测，并作为暴发和现场试验。此法简便，快速，易于操作，并易于读取结果，敏感性和特异性高(>90%)[79]。

生物芯片技术评估了多种蛋白质抗原，旨在揭示布鲁菌病患者不同感染阶段血清中不同的抗体反应，以便将来在血清学试验中用作可靠的抗原[24,80]。

与疾病的暴露、诊断和预后相关的血清学试验结果的解释，需要对临床病史和患者目前状态有准确的评估，并对实验室检测方法的价值和缺陷有所了解[26-27,58,63]。通常认为，有症状的患者布鲁菌凝集试验的阳性诊断临界滴度≥160。然而，也有活动性患者的 SAT 效价比此值低很多的病例报道[26]。此外，当怀疑为布鲁菌病而血清学试验阴性时须特别小心，因为这可能是使用不同的抗原而导致的假阴性。例如，患者感染的是犬布鲁菌，如采用流产布鲁菌或马耳他布鲁菌抗原进行血清学试验，则结果为阴性。此外，也可能是因疾病早期或单用玻片凝集试验或 SAT 试验而引起的假阴性，此时，应当在 1～2 周后重复检测[63,73]。建议采用凝集试验(SAT)和非凝集试验(如布鲁菌捕获试验或间接 Coombs 试验)进行联合检测，以明确排除布鲁菌属感染。

急性布鲁菌病，布鲁菌特异性抗体 IgG、IgM、IgA、IgE、IgG1 和 IgG3 升高，而慢性布鲁菌病，IgG、IgA、IgE、IgG1 和 IgG4 升高[26,63]。监测治疗反应需要连续随访患者的血清滴度。血清滴度降低意味着预后良好，抗体持续高滴度则需要连续监测，而抗体滴度再次升高可能提示复发或再感染。玻片或试管凝集试验的抗体滴度下降比 Coombs 试验、布鲁菌捕获试验和 EIA 都快，后者滴度阳性可维持数年(如 2～3 年)。治愈后患者抗体滴度维持阳性的意义尚未明确[63,74,76,81-82]。布鲁菌特异性抗体 IgG 和 IgA(而不是 IgM)滴度再次升高可诊断疾病复发[74-76]。研究人员正在寻

找可区分活动性与非活动性疾病的标志物。例如,研究发现,用 ELISA 检测抗布鲁菌胞质或周质蛋白抗体,其滴度仅在活动性患者中升高,故与 LPS 抗体相比,它可更好地预测治疗效果[81,83-85]。

虽然目前血清学试验在布鲁菌病患者的调查中有着非常重要的作用,但其仍存在一些局限。主要是缺少标准化的抗原制备和分析方法,同时有一些患者在治愈后仍然保持高滴度的抗体水平[63]。血清学的假阳性结果罕见。然而,近期在美国有 2 例假阳性报道。这不仅导致不必要的治疗,而且还引发了广泛的公共卫生调查[86]。假阴性结果主要是直接凝集法导致的,比如用 SAT 法检测局灶性并发症或慢性布鲁菌病病例[26,63]。血清学试验阴性而培养阳性的情况也有相关描述,尽管很罕见。

十四、药物敏感性试验

由于多方面原因,布鲁菌属的常规药敏试验并未开展。这些原因包括:对四环素类、利福平和氨基糖苷类耐药罕见;质粒的缺乏;实验室安全的考虑;多种抗菌药物(包括 β-内酰胺类、喹诺酮类、替加环素和厄他培南等)体外活性高水平和临床疗效之间相关性差;普遍缺乏完善的测试条件和解释标准[87-92]。但是,一项研究报道利福平的耐药率为 48%[92]。之前,CLSI 发布指南,提出以 MH 肉汤稀释法检测四环素和多西环素对布鲁菌的 MIC 值[88]。对在含绵羊血或马血清的 MH 琼脂上用 E 试验来研究药物的协同试验也有描述[93]。

十五、抗布鲁菌治疗

合理的抗生素治疗可降低人布鲁菌病的发病率,预防并发症,并可最大限度地减少复发。多种抗布鲁菌的药物(如多西环素、利福平、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑、链霉素、庆大霉素、一些氟喹诺酮类和头孢菌素类)已被用于治疗,成功率各不同。目前,最有效的治疗方案和最佳的治疗周期仍不清楚[94-95]。

据报道,联合药物治疗比单一药物治疗复发率更低。对于无并发症的成年患者,WHO 推荐口服多西环素和利福平 6~8 周,但多西环素与链霉素或庆大霉素联合治疗方案治愈率更高。8 岁以上的儿童推荐使用多西环素(45 天或 8 周)联合庆大霉素(5~7 天)或链霉素(14 天),多西环素联合利福平或甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(6 周)。8 岁以下儿童推荐使用庆大霉素(5~7 天)联合甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(6 周)或甲氧苄啶-磺胺甲噁唑联合利福平(6 周)[32,46]。

心内膜炎和神经型布鲁菌病患者推荐使用多西环素、利福平、氨基糖苷或头孢曲松的三联疗法治疗 2~3 个月[54,87,96]。

使用氟喹诺酮类和广谱头孢菌素类药物的治疗方案已有报道。尽管这些药物对布鲁菌的 MIC 较低,但与采用标准治疗方案的患者相比,采用这些治疗方案的患者复发率更高。氟喹诺酮类药物联合利福平治疗菌血症和复杂布鲁菌病可出现不同的治疗效果[95-96]。一项系统评价和 meta 分析研究涵盖了 30 个试验和 77 个治疗组,该研究表明在菌血症和复杂布鲁菌病患者中,相对于多药治疗,单一药物治疗的失败率和复发率更高,且治疗时间更短(<6 周)。首选治疗方案是包括氨基糖苷类的双联或三联疗法[95]。一项研究表明,疾病发作后延误治疗超过 3 个月将显著降低治愈率[97]。

关于实验室高风险暴露后的预防治疗(多西环素和利福平治疗 3~6 周)问题还存在争议,暴露后管理指南是经验性的指南[17,98]。然而,在可能暴露后还是建议采集基线血液标本,每周监测症状,直至 6 个月,同时在第 0、2、4、6 和 24 周分别进行血清学监测[17]。

十六、疾病预防

疫苗已成功用于控制家畜感染,并进而降低人类感染率。布鲁菌病兽用疫苗主要有:用于牛的减毒流产布鲁菌(S19 株)和更稳定的粗糙型突变的流产布鲁菌(RB51 株)疫苗,用于绵羊和山羊的马耳他布鲁菌(Rev-1 株)和用于猪的猪布鲁菌 2 型。然而,用于预防人布鲁菌病的疫苗效果有限,且存在严重的医源性不良反应[24,99-100]。乳制品和相关食品通过加热可有效防止布鲁菌的传播。提高公众对该病的认识,加强人类和动物卫生管理部门之间的合作,是控制和预防布鲁菌病

最具成本效益的方法[1]。

十七、结果的评价、解释和报告

布鲁菌属细菌是一种“隐性的”和强感染性的病原菌，其疾病谱范围广泛，既包括局部性病灶，也包括复杂的系统性疾病。对布鲁菌病的经验性诊断可加快相应的实验室检测，使患者得到及时治疗，以避免严重的并发症发生。通过恰当使用试验方法和正确解释结果，就可以做出正确的临床决策；血清学试验是明确诊断最可靠的实验方法。实验室需将2种凝集试验联合起来进行诊断，如SAT和间接Coombs试验，SAT和布鲁菌捕获试验，ELISA检测IgG和IgM抗体等。为达到此目标，实验室必须具备检测疾病不同阶段抗体的能力，因为在疾病急性期，可能任一检测项目都是阳性的，而在慢性、复杂或局灶性病例中，SAT试验可能为阴性，而Coombs试验、布鲁菌捕获试验及ELISA检测IgG抗体可能为阳性（表49-2）。另外，还需注意的是，任何血清学试验结果必须结合患者病史进行解释[26-27,58,63]。

表49-2 常用的免疫球蛋白血清学试验结果的解释及其在人类布鲁菌病不同类型/阶段中的诊断价值

检测方法	免疫球蛋白的检测			在不同疾病类型的诊断价值			
	IgG	IgM	IgA	急性	慢性	局灶性	复发
玫瑰红/玻片试验	+	+	+	+	−	−	−
试管(SAT)或微孔板凝集试验	+	+	+	+	−	−	−
间接Coombs试验	+	−	−	+	+	+	+
布鲁菌捕获试验	+	−	+	+	+	+	+
EIA	+	+	+	+	+	+	+

疑似病例一定要进行细菌培养，若培养阳性可明确诊断；并且，对于培养的细菌应该鉴定到种的水平，以便进行流行病学追踪；此外，还应该进行药物敏感性试验。在美国，实验室若发现潜在的布鲁菌属细菌，必须立即通知公共卫生部门，将分离株送至最近的应急实验室网络参考实验室进行确证。分子生物学方法虽然尚未规范，且大部分仍是研究手段，但经优化后可应用于实验室检测。

参考文献请扫二维码查阅

第 50 章　巴尔通体属*

J. STEPHEN DUMLER, KAREN C. CARROLL, ROBIN PATEL

（姚开虎　译；金大智、王辉　审校）

一、分类

分类和种属特性描述

巴尔通体属（*Bartonella*）[包括先前称为罗卡利马体属（*Rochalimaea*）和格拉汉体属（*Grahamella*）的一些种]为短小、兼性、胞内、多形、革兰阴性的球杆或杆菌，直径 0.2～0.6 μm，长 0.5～1.0 μm（图 50-1）。这个属的绝大多数成员都是兼性胞内菌，能够寄生于红细胞、内皮细胞和（或）其他哺乳动物宿主细胞。该属细菌可引起猫抓病（cat scratch disease，CSD），在健康人群和动物能引起持续性菌血症（bacteremia），在免疫抑制患者可引起血管增生性感染，以及其他临床表现。杆状巴尔通体（*Bartonella bacilliforms*）是模式种，巴尔通体属是巴尔通体科（Bartonellaceae）的唯一成员，在变形菌门（Proteobacteria）隶属于 α-变形杆菌纲（Alphaproteobacteria）的 α-2 亚群和根瘤菌目（Rhizobiales）。

巴尔通体所有种的基因组都很小，平均为 1.8 Mbp，范围从杆状巴尔通体的 1.4 Mbp 到蜜蜂巴尔通体（*B. apis*）的 2.9 Mbp[1]。一个关键的基因组特征是Ⅳ和Ⅴ型分泌系统的基因数目，分泌系统可将细菌效应器递送入宿主细胞中，调节细胞侵袭力并影响宿主对感染的反应[1-2]。现已命名 35 个种和文氏巴尔通体（*Bartonella vinsonii*）3 个亚种（http://www.bacterio.net/bartonella.html），其中有 14 种与人类疾病相关[2-3]。此外，至少另有 11 种巴尔通体“种”被描述，但还没有分类，其中 5 种基因组测序已完成或正在进行中，还有 4 种已被确认为可能是人类病原体[2-3]。

本属的模式种杆状巴尔通体是卡里翁病（Carion's disease）的病原。此病特征性的表现为急性溶血性菌血症，即奥罗亚热（Oroya fever），或者表现为慢性血管增生性病变，出现结节性血管性皮肤红斑，即秘鲁疣（verruga peruana）。其他导致卡里翁病类似表现的致病原包括：安卡什巴尔通体（*B. ancashensis*）和五日热巴尔通体（*B. quintana*），五日热巴尔通体是战壕热（trench fever）的病原，导致发热性菌血症性疾病，临床表现包括肌痛、寒战、头痛和严重的腿痛。五日热巴尔通体也是杆菌性血管瘤病（bacillary angiomatosis，BA）的病原。BA 的特征是引起免疫缺陷患者，尤其是 AIDS 患者出现血管增生性病变[4-5]。五日热巴尔通体是无家可归者培养阴性的心内膜炎和菌血症的常见病原[6-7]。BA 也可由汉氏巴尔通体（*B. henselae*）引起；这个种还与一种称为杆菌性紫癜性肝炎（bacillary peliosis hepatis）有特殊的联系，多发生在免疫功能低下的患者，特别是患有艾滋病的患者[5]。历史上发现汉氏巴尔通体和 CSD 相关，对于免疫正常个体（尤其儿童），典型表现为自限性感染，但是 CSD 可能因偶有表现为视神经视网膜炎、肉芽肿性肝炎、骨髓炎或不明原因的发热而变得复杂。汉氏巴尔通体也与人类血液培养阴性的心内膜炎有关，通常发生于异常心脏瓣膜的患者。也有报道心内膜炎可由伊丽莎白巴尔通体（*B. elizabethae*）、阿尔萨斯巴尔通体（*B. alsatica*）、克勒巴尔通体（*B. koehlerae*）、

*本章包含 Ricardo G. Scorpio 和 J. Stephen Dumler 在本手册第 11 版第 48 章呈现的部分内容

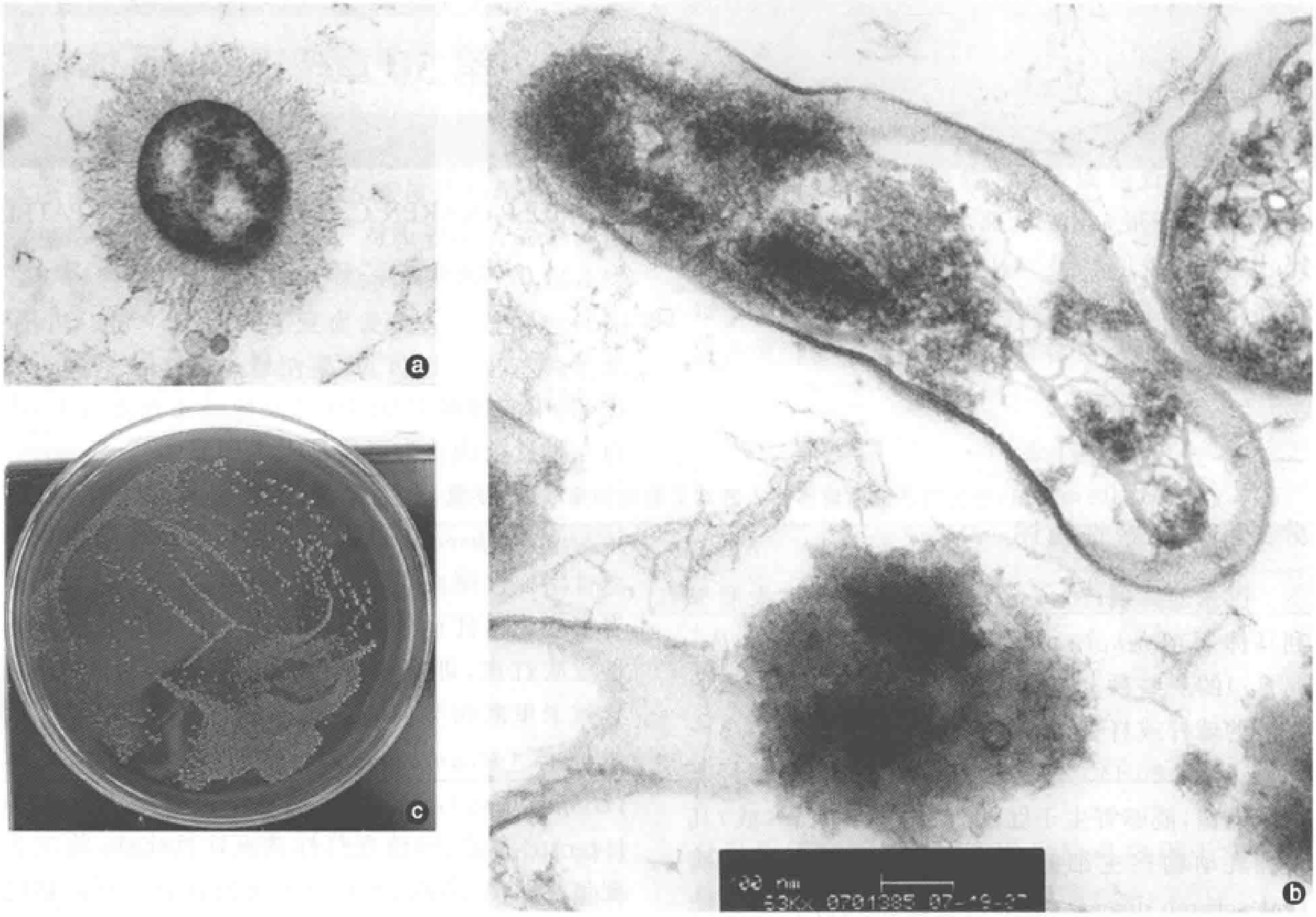


图 50-1 汉氏巴尔通体 Marseille

注：a. 文氏巴尔通体伯氏亚种基因型Ⅲ；b. 电子显微镜图像；c. 汉氏巴尔通体菌株休斯敦Ⅰ在 36℃、5% CO_2 条件下血琼脂平板上培养 10 天后的菌落形态，见彩插

"梅奥蒂莫内巴尔通体暂定种（Candidatus *Bartonella mayotimonensis*）"和文氏巴尔通体阿如波亚种（*Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*）及文氏巴尔通体伯氏亚种（*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*）引起[2]，"瓦肖巴尔通体暂定种（Candidatus *Bartonella washoensis*）"曾引起心肌炎和脑膜炎各 1 例[8-9]。格拉汉姆巴尔通体（*Bartonella grahamii*）与 CSD、人视神经视网膜炎和双侧视网膜分支动脉闭塞有关[10-12]。文氏巴尔通体阿如波亚种（*B. vinsonii* subsp. *arupensis*）从一名患菌血症的农场主分离出来，患者有发热和轻度的神经系统表现[13]。更多新的、尚未深入研究、分离或检测自人类的巴尔通体包括罗查利马巴尔通体（*B. rochalimae*）、"塔米巴尔通体（*B. tamiae*）"和部族巴尔通体（*B. tribocorum*）[14-16]。

二、流行病学和传播

巴尔通体典型的传播依靠昆虫媒介（如蚤、白蛉、体虱）和潜在的媒介（如扁虱、螯蝇和无翼蝇）。传播也可通过动物的抓挠或啃咬。有些种的地域分布非常局限；如杆状巴尔通体只出现于南美安第斯山区特定海拔区域，这是因为它的媒介昆虫——疣肿罗蛉（*Lutzomyia verrucarum*）[3]是一种分布区域有限的白蛉。其他巴尔通体，如五日热巴尔通体、汉氏巴尔通体、伊丽莎白巴尔通体和文氏巴尔通体伯氏亚种呈全球分布[17]。五日热巴尔通体感染暴发与环境和个人卫生条件均差的无家可归的人群有关。人如果存在大量体虱，即人虱（*Pediculus humanus*）寄生，这些节肢动物排泄物中包含的五日热巴尔通体就可以通过破损皮肤

感染机体[18-19]。

猫是汉氏巴尔通体、克拉里奇巴尔通体(*B. clarridgeiae*)和克勒巴尔通体主要宿主。CSD主要由汉氏巴尔通体感染所致，它通过猫栉头蚤(*Ctenocephalides felis*)在猫与猫之间传播，尚不能确定直接猫蚤传播是否引起人CSD。人类感染更可能是通过抓伤而接触了感染性蚤的排泄物所致[20]。流浪猫、户外生活的猫和小猫更容易出现菌血症。通常在温暖潮湿的、猫蚤丰富的地区，汉氏巴尔通体感染的流行率最高。在家猫群中，汉氏巴尔通体抗体流行高达81%[21-22]，基因型Ⅰ(休斯敦)在远东地区(日本、菲律宾)的猫中更为常见，而在西欧、北美和澳大利亚地区则以基因型Ⅱ(法国、马赛)为主[20]。与狗相似，猫也可同时感染不同种的巴尔通体[23]。另外，可以从猫蚤中检测到五日热巴尔通体、克勒巴尔通体和克拉里奇巴尔通体的DNA，这表明猫蚤可能是这些病原菌的虫媒。虽然研究者在全世界很多地区的硬蜱中检测到巴尔通体的DNA，但是从未有证据表明巴尔通体可通过蜱传播至人[24-25]。

巴尔通体中19个种和亚种能感染人类，包括安卡什巴尔通体、杆状巴尔通体、罗查利马巴尔通体、阿尔萨斯巴尔通体(*B. alsatica*)、克拉里奇巴尔通体、多斯巴尔通体(*B. doshiae*)、伊丽莎白巴尔通体、格拉汉姆巴尔通体、汉氏巴尔通体、克勒巴尔通体、“梅奥蒂莫内巴尔通体暂定种”、五日热巴尔通体、申贝巴尔通体(*B. schoenbuchensis*)，“塔米巴尔通体”、部族巴尔通体、文氏巴尔通体阿如波亚种、文氏巴尔通体伯氏亚种、“瓦肖巴尔通体暂定种”，其引起多种不同的临床表现，包括皮肤血管炎、心内膜炎、心肌炎、杆菌性血管瘤病、杆菌性紫癜性肝炎和肉芽肿性炎症性疾病(表50-1)[2-3,26]。其他巴尔通体种，如蜜蜂巴尔通体、刺鼠巴尔通体、伯特利巴尔通体(*B. birtlesii*)、牛巴尔通体(*B. bovis*)、腹松鼠巴尔通体(*B. callosciuri*)、犬巴尔通体(*B. capreoli*)、邵氏巴尔通体(*B. chomelii*)、库伯平原巴尔通体(*B. coopersplainsensis*)、弗洛伦斯巴尔通体(*B. florencae*)、抚远巴尔通体(*B. fuyuanensis*)、黑瞎子巴尔通体(*B. heixiaziensis*)、跳鼠巴尔通体(*B. jaculi*)、日本巴尔通体(*B. japonica*)、肥尾沙鼠巴尔通体(*B. pachyuromydis*)、白足鼠巴尔通体(*B. peromysci*)、昆士兰巴尔通体(*B. queenslandensis*)、澳洲鼠巴尔通体(*B. rattaustraliani*)、塞内加尔巴尔通体(*B. senegalensis*)、森林巴尔通体(*B. silvatica*)(译者注：此处原文为*B. sylvatica*，有误)、鼹鼠巴尔通体(*B. talpae*)、泰勒巴尔通体(*B. taylorii*)和文氏巴尔通体文氏亚种仅从动物血样中分离到，包括野生啮齿动物、松鼠、猫科动物、犬科动物和反刍动物，如牛、鹿和马鹿等[17,27-28]。家养和野生犬科动物是文氏巴尔通体伯氏亚种的主要宿主，热带国家的狗体内抗体阳性很常见[20]，加利福尼亚土狼(草原狼)中菌血症也非常普遍[29]。

表50-1 已报道的巴尔通体种或亚种，以及它们的主要储存宿主、确定或可能的媒介和报道过的偶然宿主

巴尔通体种	分类状态	主要储存宿主	媒介或可能媒介	偶然宿主
刺鼠巴尔通体，新种(*B. acomydis* sp. nov.)	已核准	啮齿类	蚤?	?
阿尔萨斯巴尔通体(*B. alsatica*)	已核准	兔子(家兔)	蚤? 蜱?	人
杆状巴尔通体(*B. bacilliformis*)	已核准	人	白蛉	?
伯特利巴尔通体(*B. birtlesii*)	已核准	木鼠(姬鼠)	蚤?	?
牛巴尔通体(*B. bovis*)	已核准	圈养牛(家牛)	螫蝇? 蜱?	猫，狗
腹松鼠巴尔通体(*B. callosciuri*)	已核准	啮齿类	蚤?	?
犬巴尔通体(*B. capreoli*)	已核准	獐鹿(狍)	蜱?	?
邵氏巴尔通体(*B. chomelii*)	已核准	牛(圈养牛)、狗	螫蝇? 蜱? 虱?	?
克拉里奇巴尔通体(*B. clarridgeiae*)	已核准	猫(家猫)	蚤? 虱子?	人? 狗
库伯平原巴尔通体(*B. coopersplainsensis*)	已核准	亚洲、澳洲啮齿动物	蚤?	?
多斯巴尔通体(*B. doshiae*)	已核准	田鼠、大鼠	蚤? 蜱?	?

（续 表）

巴尔通体种	分类状态	主要储存宿主	媒介或可能媒介	偶然宿主
伊丽莎白巴尔通体（*B. elizabethae*）	已核准	大鼠（挪威鼠）、沙鼠（壮沙鼠）？	蚤？	人，狗
格拉汉姆巴尔通体（*B. grahamii*）	已核准	田鼠（鼾种）、小鼠（姬鼠种）、鼠（褐家鼠）、鹿（獐朝鲜亚种）	蚤？蜱？水蛭？	人，狗
汉氏巴尔通体（*B. henselae*）	已核准	猫（家猫）	蚤，蜱？	人，狗
跳鼠巴尔通体（*B. jaculi* ）	已核准	啮齿类	?	?
日本巴尔通体（*B. japonica*）	已核准	野鼠（银姬鼠）	?	?
克勒巴尔通体（*B. koehlerae*）	已核准	猫（家猫）、野猫	蚤？蜱？	人，狗
蜱蝇巴尔通体（*B. melophagi*）	未明确[a]	绵羊（羊属物种）	绵羊蜱（绵羊虱蝇）	人
肥尾沙鼠巴尔通体（*B. pachyuromydis*）	已核准	啮齿类	?	?
白足鼠巴尔通体（*B. peromysci*）	已核准	野鼠（白足鼠种）	蚤？	?
昆士兰巴尔通体（*B. queenslandensis*）	已核准	鼠（家鼠）、板齿鼠属	?	?
五日热巴尔通体（*B. quintana*）	已核准	人	人体虱	猫，狗
澳洲鼠巴尔通体（*B. rattaustraliani*）	已核准	澳大利亚大鼠	蜱？	?
"澳大利亚鼠巴尔通体（*B. rattimassiliensis*）"	无法律地位	大鼠（家鼠种）	蚤？ 虱？恙螨？	?
罗查利马巴尔通体（*B. rochalimae*）	已核准	狐、土狼、狗鼠、臭鼬	蚤（蚤属（*Pulex*），禽冠蚤（*Echidnophaga gallinacean*））？蜱？	人
申贝巴尔通体（*B. schoenbuchensis*）	已核准	牛、獐鹿（狍）、驼鹿	Deer keds？绵羊蜱？螫蝇？蜱？	?
森林巴尔通体（*B. silvatica*）	已核准	日本野鼠（大林姬鼠）	?	?
鼹鼠巴尔通体（*B. talpae*）	已核准	鼹鼠（欧洲鼹鼠）	蚤？	
塔米巴尔通体"（*B. tamiae*）"	无法律地位	大鼠（家鼠种）	蚤？蜱？苍蝇	人
泰勒巴尔通体（*B. taylorii*）	已核准	小鼠（姬鼠种）、田鼠（红背和棕背种）、鼠兔（高原鼠兔）	蚤？蜱？	?
部族巴尔通体（*B. tribocorum*）	已核准	大鼠（家鼠种）、小鼠（姬鼠种）	蚤？螨虫？	人？
文氏巴尔通体阿如波亚种（*B. vinsonii* subsp. *arupensis*）	已核准	白足小鼠（白足鼠）	蚤？蜱	人
文氏巴尔通体伯氏亚种（*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*）	已核准	土狼（郊狼）、狗（家犬）、狐狸（灰狐）	蜱	人
文氏巴尔通体文氏亚种（*B. vinsonii* subsp. *vinsonii*）	已核准	草原田鼠（宾夕法尼亚田鼠）	耳螨（微小恙螨）	?
"飞鼠巴尔通体（*B. volans*）"	无法律地位	南部飞鼠（南方鼯鼠）、海獭（北方海獭和南方海獭）	蚤？	人？马？
"瓦肖巴尔通体暂定种土拨鼠亚种（Candidatus *B. washoensis* subsp. *cynomysii*）"	未有效发表	加州地松鼠（加州黄鼠）、兔（家兔）、草原犬鼠（黑尾草原犬鼠）	蚤？蜱？	人，狗

注：[a] 已确认为 *Wolbachia melophagi*

此外，全球范围内，众多广泛的啮齿类动物宿主可被适应其生活的巴尔通体所感染[2]。最后，还有几种巴尔通体能从家养和野生反刍动物体内分离出来，对它们来说，螫蝇可能是这些动物之间传播的重要媒介[17]。最后，蝙蝠相关的巴尔通体物种在世界范围内日益得到确认[30]；其与人类或动物疾病的可重复验证的关系尚未出现。

三、临床表现

一体化健康(One Health)的策略表明,动物媒介传播人畜共患病原可以感染人类并致病。虽然发现了广泛的人类临床情况与已确认的和潜在的巴尔通体感染有关,但大多数的因果关系尚未确定[31]。与人类疾病已建立关系的巴尔通体物种导致的感染可分为主要以人类为存储库[人类巴尔通体病(bartonellosis)]和以动物为存储库(人畜共患巴尔通体病)]两大类。一般来说,每个巴尔通体物种都是通过其同源的嗜血节肢动物媒介传播的。

(一)人类巴尔通体病

1. 奥罗亚热和秘鲁疣(卡里翁病):杆状巴尔通体 早在前哥伦布时代,安第斯山脉的居民群就已经认识到杆状巴尔通体所致疾病,尤其是其称为秘鲁疣的慢性表现[3]。但是,急性(奥罗亚热)与慢性之间的可疑联系直到 1885 年才最终确定。那时,一位叫 Daniel Carrion 的医学生给自己接种疣状皮损提取物后死于奥罗亚热。该病的急性型主要见于流行地区的外来人群,表现为进行性、严重的发热性贫血伴与杆状巴尔通体感染相关的血管内溶血。据报道,在抗生素使用以前,该病的病死率为 40%到 90%不等。尽管非流行地区也报道过经证实的持续感染[3],但慢性菌血症主要发生于流行地区的本地人。急性感染后数周到数月进入疾病的第二阶段,特点是出现皮肤结节性血管增生性病变,称为秘鲁疣;也会出现黏膜和体内损伤[32]。虽然此阶段有利于痊愈,但这些损伤可持续数月之久。另一个引起秘鲁疣的种是安卡什巴尔通体(*B. ancashensis*)[14,33]。虽然"容多尼亚巴尔通体暂定种(Candidatus *Bartonella rondoniensis*)"是一种遗传学相似的细菌,但它只从法属圭亚那的接吻虫中分离出来[34],没有从人类分离到。

2. 战壕热、杆菌性血管瘤病、心内膜炎和持续发热:五日热巴尔通体 战壕热或五日热是周期性发热,其特点为 3~5(或更多)次发热,持续 4~5 天,而这种发热一般在潜伏期 15~25 天后出现。常见症状除了乏力、食欲下降、腹痛、烦躁和失眠外,还包括严重的头痛和胫骨痛。也有轻症和无症状感染的报道[6,35]。五日热巴尔通体是培养阴性心内膜炎的一个病因[2,26]。在艾滋病患者中,五日热巴尔通体引起的菌血症发展隐匿,特点为反复发热、头痛和肌痛。五日热巴尔通体和汉氏巴尔通体是两种导致 BA 的巴尔通体。BA 也称为上皮样血管瘤病,是皮肤血管增生性疾病,特点为紫红、粉红或无色丘疹,而后发展成结节性皮损,临床上像卡波西肉瘤(Kaposi sarcoma,KS),但其组织学与 KS 皮损明显不同。播散性 BA 患者可出现发热、体重下降和乏力。皮下结节和溶骨性病变通常与五日热巴尔通体感染相关,而不是汉氏巴尔通体;但是,杆菌性紫癜性肝炎仅由汉氏巴尔通体引起[36]。

(二)人畜共患巴尔通体病

1. 猫抓病的病原 汉氏巴尔通体是人类 CSD 主要的致病原[37-38],格拉汉姆巴尔通体[11]也是少数病例的可疑病原。据估计,美国每年人类 CSD 有 12 500 例,平均年发病率为 4.7/10 万人[39-40]。≤14 岁的儿童占受累者的 33%[41]。其流行有季节性,大多数病例出现于秋冬季。

典型 CSD 病例在猫抓或咬伤 1~3 周后出现临床症状。50%的患者受伤部位有小的皮损,类似于虫咬,通常位于手或前臂。皮损从丘疹发展为小疱,有时形成部分愈合的溃疡。这些损伤通常在数天到数周可以恢复。暴露后大约 3 周出现淋巴结炎,一般都是单侧。常累及肱骨内上髁、腋窝和颈部淋巴结。淋巴结肿大、痛,且肿大持续数周到数月。25%的 CSD 病例可出现化脓。绝大多数患者呈现全身感染症状:发热、寒战、乏力、厌食和头痛。一般来说,该病是良性的,淋巴结肿大可自愈,没有后遗症,无须抗生素治疗。5%~10%的 CSD 病例临床表现不典型。这些患者多表现为帕里诺眼-腺综合征(Parinaud's oculoglandular syndrome),出现耳前淋巴结肿大和睑结膜炎;视网膜炎也是 CSD 较为常见的非典型表现,但也可出现脑膜炎、脑炎、溶骨性病变和血小板减少性紫癜。脑病是 CSD 最严重的合并症之一,通常发生在淋巴结肿大 2~6 周后,但通常可以完全康复,很少或没有后遗症[42]。

汉氏巴尔通体也是儿童持续发热和不明原因发热的常见原因[43]。风湿病表现包括结节性红斑、白细胞破碎性血管炎和不明原因发热伴肌痛、溶骨性病变和关节痛。

汉氏巴尔通体所致的播散性 BA 患者可出现

发热、体重下降、乏力和内脏肿大，这些表现典型地出现于免疫功能受损的个体，特别是艾滋病患者。汉氏巴尔通体诱发的血管性增生累及实质性脏器，易出现杆菌性紫癜性肝炎和脾杆菌性紫癜。这些损伤包括肝或脾多位点出血，部分内皮细胞系网状结构受损[44]。BA 患者在流行病学上与猫和猫蚤暴露有关[36]。极少的病例提示汉氏巴尔通体和五日热巴尔通体可能与艾滋病相关的脑损伤、脑膜脑炎、脑病、痴呆和神经心理功能下降有关[41]。除了艾滋病患者外，汉氏巴尔通体感染在细胞免疫低下的其他类型患者中也越来越多地被描述，例如实体器官移植的成人和儿童[45-46]。

2. 与心内膜炎、心肌炎、视神经视网膜炎、发热和神经系统症状相关的病原 几种动物源性巴尔通体可引起人的血培养阴性的心内膜炎或心肌炎[2,26]，包括汉氏巴尔通体、克勒巴尔通体、伊丽莎白巴尔通体、阿尔萨斯巴尔通体(*B. alsatica*)、“梅奥蒂莫内巴尔通体暂定种”、文氏巴尔通体伯氏亚种、文氏巴尔通体阿如波亚种和“瓦肖巴尔通体暂定种”。在法国，所有心内膜炎病例中，巴尔通体占 3%～4%，在世界上一些地区血培养阴性的心内膜炎中，巴尔通体占比高达 50%[26,47]。一些啮齿动物源性巴尔通体也与视神经视网膜炎(伊丽莎白巴尔通体和格拉汉姆巴尔通体)[10,48]，或伴有菌血症和神经系统症状的发热(文氏巴尔通体阿如波亚种)有关[13]。

3. 其他巴尔通体种或亚种 很多种巴尔通体对动物或人的临床影响还是未知的。在无症状菌血症动物可检测出巴尔通体，偶尔在人也可检测出，比如通过供者献血程序查出[49-50]。除了伊丽莎白巴尔通体、格拉汉姆巴尔通体、“塔米巴尔通体”和文氏巴尔通体阿如波亚种，没有其他特定的人类致病原与啮齿动物源的巴尔通体种有关。

4. 犬科和猫科动物巴尔通体 在 35 个已鉴定的巴尔通体种和 3 个亚种中，有几个是从宠物狗和猫检测或分离到的，这凸显出对于广泛接触家养动物的人群，这些细菌具有的人畜共患的潜能[13,27,51-52]。汉氏巴尔通体、克拉里奇巴尔通体、克勒巴尔通体、五日热巴尔通体、牛巴尔通体、伊丽莎白巴尔通体和文氏巴尔通体伯氏亚种可从狗分离到[53]，汉氏巴尔通体、克拉里奇巴尔通体、“瓦肖巴尔通体暂定种”、五日热巴尔通体、罗查利马巴尔通体、伊丽莎白巴尔通体和文氏巴尔通体伯氏亚种可在自然状态或实验条件下感染猫科动物[54-55]。狗和猫感染巴尔通体的临床表现谱型变化大，从未见明显异常到伴嗜睡和体重下降的亚临床感染状态。狗感染巴尔通体，可有很多临床表现，包括心内膜炎、心肌炎、鼻出血、血管增生性疾病和嗜睡[53,56-58]。猫感染巴尔通体后，较未感染猫易出现肾疾病、尿路感染、口腔炎和淋巴结肿大[27]，但是，大多数感染汉氏巴尔通体的猫看似无症状。有报道显示，实验室感染早期的猫可出现发热、淋巴结肿大、轻微神经症状和生殖紊乱[27]。

四、标本的采集、转运和储存

尽管巴尔通体已从动物和人类的血液、体液和组织中分离出来，但在常规的临床微生物学实验室中，从人类标本中培养出巴尔通体仍是一个挑战，而且阳性率很低；因此，不推荐常规分离培养。作为替代方法，血清学诊断和针对某些患者的组织病理学和(或)核酸扩增实验成为首选。CSD 患者很少有可培养出的杆菌。例如，在一项研究中，83 份 PCR 阳性的 CSD 相关人类标本中，仅 21%的标本中发现汉氏巴尔通体，这些标本包括淋巴结活检标本或抽吸物、皮肤或浅表黏膜拭子或活检标本，使用溶马血琼脂且 100 mg/L 的氯化血红素进行培养。如果培养物呈阳性，则生长晚，中位阳性孵育时间为 21 天[59]。最近，有人提出，汉氏巴尔通体很少在 CSD 患者的淋巴结中存活[60]。若想做血培养，可使用 Isolator 溶血管(Alere Isolator microbial tubes；雅培)、枸橼酸钠管或塑料的 EDTA 管收集血标本[36]；再次强调，血培养不是用于检测人类病原的好的选择，尽管该检测可能在动物中更有用。从感染汉氏巴尔通体的猫中采集血标本，并将其置于 EDTA 和 Isolator 溶血管中，培养的阳性率高。EDTA 管 −65℃保存 26 天，敏感性不会下降[61]。

从感染淋巴结、皮损或各种器官、心脏瓣膜、玻璃体液体、脑脊液等采集的组织标本可提取 DNA，使用核酸扩增试验(nucleic acid amplification technique，NAAT)检测。虽然新鲜组织更适于 NAAT，但也可使用石蜡包埋的组织[62-63]。细针抽吸标本也成功通过 NAAT 用于巴尔通体的检测[63]。

五、直接检测

(一)显微镜检查

在血涂片的红细胞中,可以查见杆状巴尔通体[3]。CSD 和 BA 的组织病理学是典型的,但并不特异。Warthin-Starry 银染是镜检福尔马林固定、石蜡包埋的组织切片中巴尔通体的推荐方法,但此法不易实施,特异性不高,也相对不敏感,即使 CSD 患者淋巴结活检时也是如此(图 50-2a)。在 BA 患者中,Warthin-Starry 银染组织中可以查到大量杆菌,有些形成团块(图 50-2b)。

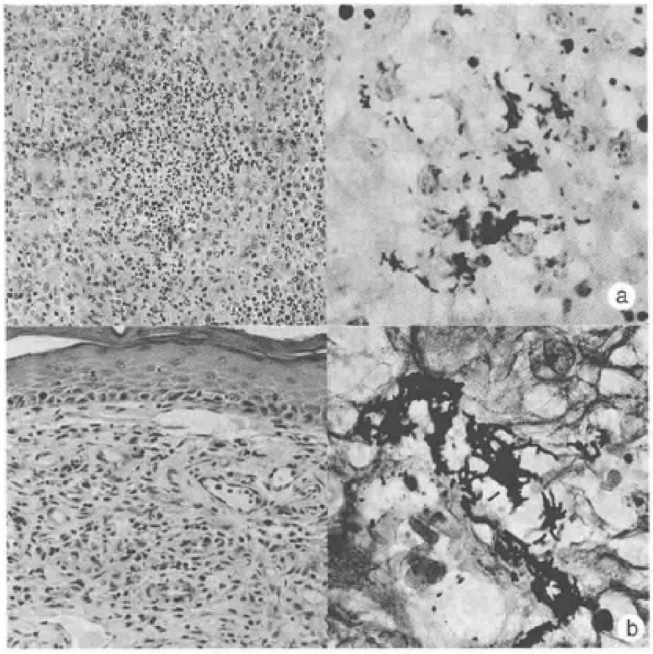


图 50-2 a. CSD 淋巴结组织病理学显示肉芽肿性炎症内星状小脓肿(左:苏木素和伊红染色;放大 400 倍),内部散在杆菌(右:Warthin-Starry 银染;放大 1000 倍);b. 杆菌性血管瘤病皮肤活检,显示真皮血管增生和中度间质炎症(左:苏木素和伊红染色;放大 400 倍)和真皮层内的杆菌群(右:Warthin-Starry 银染;放大 1000 倍),见彩插

(二)抗原检测

免疫细胞化学染色是一项尚未广泛使用的特异性技术[5]。例如,血涂片直接免疫荧光(immunofluorescence)检查可用于快速检测急性战壕热患者和无家可归的菌血症患者中的五日热巴尔通体。

(三)核酸检测

被感染的组织和体液可送检进行巴尔通体特异性的 NAAT。血液也可进行检测,但检测敏感性较低,即使在心内膜炎的情况下也是如此。相反,在心内膜炎的病例中,从切除的心脏瓣膜组织中经常可以扩增出巴尔通体的 DNA。然而,对于所有这些情况,血清学检查应被视为首选诊断方法。16S rRNA 基因最初由 Relman 等[64]于 1990 年用于鉴定 BA 的微生物病原学。但是,尽管该基因有助于检测巴尔通体的种类,但它并不能区分所有的巴尔通体种类。巴尔通体特异性 NAAT 使用最广泛的目标基因是编码枸橼酸合成酶(*gltA*)、热休克蛋白(*groEL*)、核黄素合成酶(*ribC*)、细胞分裂蛋白(*ftsZ*)和 17-kDa 抗原的基因[65]。*gltA* 和 *rpoB*(RNA 聚合酶 β 亚基)序列与巴尔通体物种水平鉴定(identification)研究中的 DNA-DNA 杂交结果一致[65]。位于 16S 和 23S rRNA 基因之间的内转录间隔区(internal transcribed spacer,ITS)是巴尔通体诊断、种类鉴定和基因分型有用的诊断靶标[23,51,66-68]。

六、分离步骤

巴尔通体是一种生长缓慢、革兰阴性多形性杆状体,生长需要血红素。血红素的来源包括血红蛋白、红细胞和氯化血红素等经常添加到琼脂基中的补充剂,如哥伦比亚琼脂、胰蛋白酶大豆琼脂、布鲁琼脂或心浸出液琼脂[2]。巴尔通体种(除外杆状巴尔通体和克拉里奇巴尔通体)的最适生长条件是在 35~37℃的 5%二氧化碳中培养。在没有二氧化碳的情况下,杆状巴尔通体和克拉里奇巴尔通体在 25~30℃的温度下生长最好。基于琼脂的方法需要长时间的培养,容易被其他非苛养菌过度生长,也容易受到霉菌污染。据报道,基于细胞培养的系统更敏感,但临床实验室很难有此条件。

包括移植受体在内的免疫功能受损患者,他们的菌血症水平常高于免疫功能正常者,但当患有心内膜炎时情况有所不同。此时免疫功能不全和正常者血培养分离巴尔通体敏感性相同[5]。但是,将巴尔通体感染的血样加入基于 CO_2 检测的血培养系统的肉汤中,孵育后通常不会产生浑浊

或转变足够的可氧化底物用于 CO_2 的检测。因此,这些常规使用的、全自动血培养系统(automated blood culture systems)很少能从患者血中检测到巴尔通体,除非实验室特别要求寻找它们。在这种情况下,对自动血培养瓶进行吖啶橙染色(acridine orange stain),如果吖啶橙染色呈阳性,则在富养培养基上进行盲法转种培养,可能会有帮助[7]。

将裂解离心系统(Isolator)处理的血样或者含 EDTA 抗凝管标本接种到新鲜的(灌注后 7 天内)无抗生素的 5% 兔鲜血巧克力和心浸出液琼脂(heart infusion agar),可以直接分离出巴尔通体。汉氏巴尔通体在心浸出液琼脂上有生长优势,五日热巴尔通体在巧克力琼脂上有生长优势[55]。克勒巴尔通体在心浸液琼脂上生长不好,需要新鲜的巧克力琼脂平板[55]。也可使用商业化的羊或马血琼脂平板,但分离原代巴尔通体时不敏感。血平板应该在 35℃ 5%CO_2 和高湿度环境至少孵育 4 周。在烛缸、密闭透气的塑胶袋中孵育有助于保持湿度和控制污染,这两种方法对于长时间孵育这些营养丰富的、非选择性的琼脂至关重要。对于人类标本的培养,菌落通常在 7～15 天后出现[69];相反,动物血培养时巴尔通体菌落通常 3～7 天就出现。蜡烛罐中的培养物最好在接种后 1 周才进行检查,之后每 7 天检查一次,以避免被污染和流失水分。当检测到菌落时,菌落应传代到新鲜的琼脂平板上,否则巴尔通体分离株的活力会迅速下降。

因为长期孵育,其他生长缓慢的病原菌,包括对实验室工作人员有害的生物体也能在平板上生长,因此对于阳性培养物要采取适当的安全防护措施。据报道,另一种比接种琼脂培养基更敏感的方法为,肝素化血标本沉降后收集血浆,接种到套片小管(shell vial),然后用 T84 膀胱癌细胞系采用离心壳瓶的培养技术(centrifugation-shell vial technique)进行培养(使用人内皮细胞 ECV304 是错误的)[69-70]。

应用上述的一些技术,从皮损、肝、脾、瓣膜组织或淋巴结标本中可能分离出巴尔通体;对于这些组织中有损伤的免疫正常患者,组织培养比血液更敏感[3]。对于血培养来说,使用非琼脂基方法,如套片小管培养和组织培养(内皮细胞单层),似乎更加可靠和快速[69-70]。在他们的报道中,Gutiérrez 等[62]为巴尔通体种的检测提供了基于培养和其他诊断方法的深入讨论。

七、鉴定

因为这些细菌在琼脂平板上生长缓慢(分裂时间约 24 h),标准的生化鉴定方法对于临床感染诊断是没有用的。对于富含血培养基的原代琼脂培养,该属的成员通常需要在 5% 的二氧化碳存在下 8～45 天才能形成可见的菌落(图 50-1)。各种巴尔通体菌的最适生长温度从杆状巴尔通体的 25～30℃,到汉氏巴尔通体、五日热巴尔通体、克勒巴尔通体和伊丽莎白巴尔通体等 35～37℃ 不等。巴尔通体菌落的表型特征是可变的。汉氏巴尔通体原代培养时可同时出现两种形态:①不规则、凸起的、灰白色、干、粗糙(菜花状)菌落,陷入并黏附于琼脂;②小的、圆的、黄褐色湿润菌落,很容易从琼脂表面刮掉。汉氏巴尔通体原代分离的主要菌落形态是上述第一种。五日热巴尔通体菌落通常光滑、扁平,并有光泽,比汉氏巴尔通体更显黄褐色,且不会陷入琼脂[5,36]。紧密相连和融合的五日热巴尔通体菌落可呈黏液状。克拉里奇巴尔通体长成小的、凸起的、坚实的白色黏性菌落,原代分离时也可能呈现伸展性生长。大多数巴尔通体在重复传代培养后都呈光滑菌落。杆菌很小(长 2 μm,宽 0.5 μm),最好使用 Gimenez 染色[5]。Gimenez 染色时,巴尔通体的番红或碱性品红复染着色浅。革兰染色的巴尔通体呈小的、轻微弯曲的革兰阴性杆菌,有点像弯曲菌属、螺杆菌属(*Helicobacter*)或嗜血杆菌属。菌落形态连同需孵育 7 天以上的生长特性,以及触酶和氧化酶阴性通常足以初步鉴定巴尔通体。最理想的确认巴尔通体的属、种和株的方法仍是 DNA 扩增和测序技术。

杆状巴尔通体、克拉里奇巴尔通体、犬巴尔通体、罗查利马巴尔通体和申贝巴尔通体是仅有的几种通过单极鞭毛运动的巴尔通体。汉氏巴尔通体,以及其他几种巴尔通体,在湿载片上有抽动样运动,这与其表达三聚体自转运黏附素(trimeric autotransporter adhesins,TAAs)有关(汉氏巴尔通体示例[71])。这些 TAA 负责黏附宿主细胞,可能介导与宿主红细胞和内皮细胞之间特异的相互作用[72]。

除了产生肽酶外，多数巴尔通体生化反应不活跃。各种不同的商业化鉴定系统中的数据库均未包含巴尔通体。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry，MALDI-TOF MS）已用于分离菌落的巴尔通体鉴定，一项研究显示其能区分 17 个不同的种[73]。目前 FDA 批准/整理的 MALDI-TOF MS 系统（Bruker Biotyper CA 和 VITEK MS）不包括巴尔通体种。

巴尔通体分离株的鉴定更多是基于核酸技术，其中有些方法可以鉴定种，给定种内的菌株鉴定或者基因分型。方法包括 PCR、DNA 杂交、限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism，RFLP）分析和基因测序分析[62,74]。如上所述，PCR 扩增和测序使用最广泛的靶基因包括 *gltA*、*rpoB*、内转录间隔区（internal transcribed spacer，*ITS*）、*rrs*（16S rRNA）、*groEL* 和 *ribC*。有关分子鉴定方法的详细讨论，请参阅 Gutierrez 等和 Kosoy 等的综述[62,75]。

八、分型系统

分子分型方法有助于了解巴尔通体感染的流行病学，如物种从动物和节肢动物库到人类的传播，并有助于鉴别新物种和描述其特征[75]。在过去的 20 年里，人们描述了各种类型的方法。分型方法的选择取决于目标物种及这些生物是否是从人类、猫科动物或其他非人类宿主中复苏的。例如，汉氏巴尔通体来自人的菌株比来自猫科动物的菌株同源性更强[76]，因此需要一种更具鉴别能力的分型方法。鉴于物种间基因组重排的频率存在差异，脉冲场凝胶电泳（pulsed-field gel electrophoresis，PFGE）已被证明对于五日热巴尔通体分离株的流行病学研究不可靠[77]，但似乎可用于描述汉氏巴尔通体、伊丽莎白巴尔通体和格拉汉姆巴尔通体分离株[76,78-79]。几种限制性内切酶有很好的效果，Sma Ⅰ 和 Eag Ⅰ 在一项研究中提供了最佳结果[79]，Not Ⅰ 与其他酶和其他分型方法的相关性很差[78]。

最近描述的方法似乎与 PFGE 具有相当的鉴别力，甚或更优，包括扩增片段长度多态性分析（amplified fragment length polymorphism analysis）[80]、包含 9 个基因的多位点序列分型（multilocus sequence typing，MLST）[76,80-82]、ITS（16S～23S tRNA Ala/tRNA Ile 基因间间隔区 S1）序列分型方法[83]和多间区分型方法（*multispacer typing methods*）[77]，报道认为最后两种方法最具鉴别力[81,83]。根据 16S～23S ITS 序列，文氏巴尔通体伯氏亚种可以分为四个不同的基因型[84]。Yanagihara 等[82]研究在日本从猫和人分离的汉氏巴尔通体分离株，作者能够将属于主要汉氏巴尔通体序列类型 MLST-1 菌株分为 7 个不同的 S1 基因型，显示出 MLST-1 内存在显著遗传多样性，并将猫和人类疾病的基因型联系起来。Foucault 等[77]发现了一种多间区分型方法，这种方法是基于从虱和人类中分离的五日热巴尔通体实验出的五个非编码片段，能够区分出四种基因型，与 PFGE 相比，DNA 重排没有影响分型能力。大多数关于这些分型方法的研究都受到数量少、地理边界或特定动物宿主的限制。参考文献[75]对诊断用基因分型方法进行了讨论。

九、血清学试验

目前没有 FDA 批准的用于诊断巴尔通体感染的血清学检查。因为传统培养方法困难，巴尔通体感染的血清学试验成为临床诊断最可能获得的检测方法，包括免疫荧光抗体测定（immunofluorescent-antibody assay，IFA）、酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）和 Western 杂交（Western blotting，WB）。ELISA 操作简单，容易自动化，但是敏感性低（17%～35%）[85]。抗原制备方面的改进提供了希望，例如使用来自汉氏巴尔通体的 *N*-月桂酰肌氨酸不溶性蛋白片段进行 CSD 的 IgM 诊断，或使用汉氏巴尔通体的 VirB5 17 kDa 蛋白等亚单位重组蛋白[86-88]。尽管取得了这些进展，但是采用汉氏巴尔通体和五日热巴尔通体商品化抗原玻片的 IFA 还是全球最为常用的"金标准"血清学方法。通过检测针对巴尔通体的 IgM 和（或）IgG 抗体，可评估人感染汉氏巴尔通体和五日热巴尔通体。

第一个检测 CSD 的 IFA 使用汉氏巴尔通体杆菌与 Vero 细胞共培养来抑制自身凝集[37]。该方法检测 CSD 患者血清有良好的敏感性（84%～95%）和特异性（94%～98%）[37-39]。该检测滴度为 64～256 或更高时考虑阳性，提示最近或现行感染。汉氏巴尔通

体或五日热巴尔通体引起心内膜炎，通常可查到高水平 IgG(≥800)[90]（这相当于许多美国实验室 IgG 滴度≥1024 的范围）。汉氏巴尔通体或五日热巴尔通体的 IgG 抗体滴度≥800 诊断普通人群巴尔通体感染的阳性预测值为 0.810，而在心内膜炎患者，阳性预测值为 0.955[26,90]。

然而，IFA 耗时，需要适宜设备和专业技术，且因为免疫荧光不易判读，易造成不同检测者间结果的差异[74]。人群中不同 IFA 的敏感性从 14%～100%不等，这取决于抗原的来源和实验室采用的不同阈值[85]。对某些患者来说，巴尔通体菌株的抗原变异可能导致假阴性血清学结果。不同巴尔通体种间存在交叉反应。抗原吸附可减少交叉反应[26,74]。高达 95%的标本可出现对不同巴尔通体种的交叉反应[91]。此外，文献已报道，和其他病原，如肺炎衣原体(*Chlamydophila pneumoniae*)、贝纳特柯克斯体(*Coxiella burnetii*)和斑点热群立克次体(*Rickettsia*)具有交叉反应的抗体。对于人晚期 AID 和巴尔通体的混合感染，在培养阳性或组织 PCR 阳性的患者中，抗体阳性仅占 75%[92]。另有几篇文献报道，从血清阴性患者中检测和(或)分离出巴尔通体。检测到巴尔通体 DNA 和(或)分离出该菌，但血清学中很低甚至无抗体水平，这中间的矛盾提示人群中血清学阴性的感染比目前已知的更为普遍。在免疫正常的患者中，抗体的产生可能需要数周或更长时间[37,38]。相反，经培养证实的 AIDS 患者可能永远不会产生抗体，即使在后期随访中也是如此[93]。

二氢硫辛酰胺琥珀酰转移酶、三聚体自转运黏附素(BadA，Vomps)及其他汉氏巴尔通体和五日热巴尔通体的免疫优势靶蛋白，在诊断性免疫印迹试验中具有潜在的应用价值[94-96]。但是基于免疫印迹的血清学试验未能显示清晰的免疫反应谱，这限制了它们在常规血清学诊断巴尔通体感染中的应用。

十、抗菌药物敏感性

抗菌药物敏感性试验采用血或巧克力琼脂的琼脂稀释方法(agar dilution method)，或采用补充血液的各种培养基的微量稀释法[93,97-98]。目前，临床和实验室标准研究所(Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI)和欧洲抗菌药物敏感性试验委员会(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing，EUCAST)还没有提供巴尔通体药敏结果解释的推荐意见或指南。而且需要注意的是，巴尔通体敏感性检测的培养条件(如下所述)与 CLSI 建立的标准条件不符。

E 试验(AB Biodisk，Solna，Sweden)使用哥伦比亚 5%绵羊血琼脂平板，培养 5～12 天后测量 MIC。文献评估了 E 试验与琼脂稀释法、分子耐药性检测法，证明该法的结果可比[99-100]。

在琼脂培养基或肉汤中生长时，巴尔通体属细菌对多种抗生素敏感，包括 β-内酰胺类、氨基糖苷类、氯霉素、四环素、大环内酯类、利福平、氟喹诺酮类和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑[98,101-103]，但是，体外结果不能正确反映体内活性。

巴尔通体体外药敏也能采用与真核细胞共培养的方法来检测。与以琼脂为基础的药敏试验一致，这些体外研究证明巴尔通体对很多抗生素敏感[104]。但是，不管使用什么方法，至关重要的发现是体外敏感性常与体内临床反应不一致。青霉素 G 是一个非常好的例子。在一项研究中，所有检测的 5 种巴尔通体体外均有良好的敏感性，然而青霉素 G 治疗巴尔通体感染患者，病情进行性发展，并发生新的 BA 损伤[105]。此外，尽管汉氏巴尔通体对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑具有不同的体外敏感性，但汉氏巴尔通体还是从一位服用这种抗生素的患者中分离出来[105]。而且，很多检测的抗生素仅显示出抑菌活性[104]。只有氨基糖苷类不管是在液体培养，还是内皮细胞或红细胞共培养时，都对巴尔通体表现出体外杀菌效应[101]。但是，巴尔通体是一种兼性胞内病原体，这些药物在细胞内渗透性很差。

与其他胞内细菌一样，巴尔通体的耐药性主要是内在的，或者是由于靶基因的自发突变引起。例如，不推荐氟喹诺酮类药物单一用于治疗严重巴尔通体感染，因为在 *gyrA* 的喹诺酮耐药决定区有一个自然突变，SER83→Ala[97]。一些研究者已经描述了在氟喹诺酮处理过程中产生耐药性其他可能的分子机制[97,106-107]，但是缺乏使用氟喹诺酮后体内产生耐药性的明确证据。利福霉素和大环内酯类药物耐药分别是由 *rpoB* 和 23S rRNA 基因突变引起的[108]。

体内抗生素的选择和使用　治疗巴尔通体引起的感染存在几个挑战，包括这种生物体是兼性胞内菌，受到某种程度的保护，可能导致感染持续存在和复发潜能；与某些感染相关的高病死率；免疫正常和免疫低下宿主出现广泛的和多样性疾病表现形式[46,109-110]。对典型 CSD 来说，抗生素治疗通常受益很小[97,109-110]。但是，一些研究者建议对免疫功能正常的非典型 CSD 患者进行治疗，如视神经视网膜炎、脑病和肝脾肉芽肿性疾病[109]。多西环素加利福平每日两次，建议用于视神经视网膜炎和脑病[109]。

除了免疫功能正常的非复杂 CSD 患者外，巴尔通体感染，特别是那些与高病死率或并发症相关的感染，如菌血症、心内膜炎、奥罗亚热和 BA，应采用抗生素治疗[109-110]。此外，所有免疫功能低下的巴尔通体感染者，包括单纯的 CSD，都应接受长期的抗生素治疗。一项随机的开放研究显示，较不使用抗生素治疗组，多西环素加庆大霉素可有效治疗免疫功能正常的战壕热（无心内膜炎的五日热巴尔通体菌血症）[111]。但是，给多西环素治疗的巴尔通体心内膜炎患者增加庆大霉素常因为肾衰竭而变得很复杂，有时不可逆转。巴尔通体心内膜炎是一个慢性的、进展缓慢的感染，常在发病数月后才得以诊断；诊断时或诊断后不久由于小血管炎出现肾小球肾炎报告增多，提示治疗巴尔通体心内膜炎患者使用庆大霉素应慎重[112]。目前治疗巴尔通体心内膜炎的建议是多西环素联合第二种药物治疗 6 周，如前 2 周联用庆大霉素或利福平治疗 6 周（由于庆大霉素可能导致肾衰竭，首选利福平）。利福平的细胞内渗透性和杀菌活性是利福平联合多西环素治疗巴尔通体心内膜炎的另一个原因。通常需要瓣膜手术才能治愈[2,46,109,113]。

建议治疗奥罗亚热的方法是氯霉素加 β-内酰胺或环丙沙星；对于 BA，红霉素或多西环素是首选[97,110]。读者可以参考几篇综合性综述[46,97,109-110]，以更深入地讨论与巴尔通体相关的各种综合征的治疗策略。

十一、结果的评估、解释和报告

诊断人巴尔通体感染，尤其是 CSD 的典型形式，主要是基于血清学检查，此检查是最经济、有效的方法。然而，IFA 的敏感性从 14% 到 100% 不等，这取决于选择的检测抗原、实验室阈值和检测程序[85]。对心内膜炎来说，最佳选择也是血清学试验，可增加心脏瓣膜标本进行 NAAT[114]。

特别感谢 Jane E. Koehler 的建议和校订。

参考文献请扫二维码查阅

第51章　军团菌属

PAUL H. EDELSTEIN

（姚开虎　译；金大智、王辉　审校）

一、分类

军团菌科（Legionellaceae）包括一个属，即军团菌属（*Legionella*），含 59 个有效命名（validly named）的种（http://www.bacterio.net/legionella.html）（表 51-1）。嗜肺军团菌（*Legionella pneumophila*）、米克戴德军团菌（*Legionella micdadei*）、长滩军团菌（*Legionella longbeachae*）和杜莫夫军团菌（*Legionella dumoffii*）是临床上最重要的军团菌，其中嗜肺军团菌导致了 90%以上的军团病（Legionnaires disease，LD）。军团菌科与柯克斯体科（Coxiellaceae）关系最近，两科共同组成军团菌目，隶属于 γ 变形菌纲及新门变形菌门（phylum Proteobacteria）。Q 热的病原伯内特柯克斯体（*Coxiella burnetii*）与嗜肺军团菌有许多相同的特点，两者都是胞内寄生，且一些毒力基因同源性相近[1]。一些研究者建议将塔特洛克菌属（*Tatlockia*）和荧光杆菌属（*Fluoribacter*）列为军团菌科中的属[2]，但随后 16S rRNA 的研究发现军团菌科为单系进化（monophyletic）[3]；这种属名的使用仅为史实，业内从未广泛接受。许多军团菌样细菌（*Legionella*-like bacteria）只能在自生生活阿米巴（free-living amoebae）体内生长，称为军团菌样阿米巴致病菌（legionella-like amoebal pathogens，LLAPs）。溶解军团菌（*Legionella lytica*）是一种 LLAPs，可导致人类疾病，且已有 4 种 LLAPs 划为新的军团菌种，其中 3 种可以在低温下无菌生长（grown axenically）[4]。

表 51-1　军团菌属的几个特征

军团菌种[a]	临床?[b]	血清型数[c]	长波紫外光下的颜色[d]	备注[e]
阿德莱德军团菌（*L. adelaidensis*）	N	1	NC	
不同军团菌（*L. anisa*）	Y	1	BW/YG	
伯利亚德军团菌（*L. beliardensis*）	N	1	YG	
伯明翰军团菌（*L. birminghamensis*）	Y	1	YG	
博兹曼军团菌（*L. bozemanae*）	Y	2	BW	AN：博兹曼荧光杆菌
布吕嫩军团菌（*L. brunensis*）	N	1	NC	
釜山军团菌（*L. busanensis*）	N	1	NC	
心脏军团菌（*L. cardica*）	Y	1	NC	
彻氏军团菌（*L. cherrii*）	N	1	BW	
辛辛那提军团菌（*L. cincinnatiensis*）	Y	1	YG	
詹科堤军团菌（*L. drancourtii*）	N	NK	NK	阿米巴病原体；不能在没有其他生命背景的培养基上生长（no axenic growth）
德累斯顿军团菌（*L. dresdenensis*）	N	1	wR	
爵斯基军团菌（*L. drozanskii*）	N	1	NC	30℃生长，而非 37℃

（续　表）

军团菌种[a]	临床?[b]	血清型数[c]	长波紫外光下的颜色[d]	备注[e]
杜莫夫军团菌(*L. dumoffii*)	Y	1	BW	AN：杜莫荧光杆菌
红色军团菌(*L. erythra*)	N	2	R	
费菲军团菌(*L.* fairfieldensis)	N	1	NC	
法氏军团菌(*L. fallonii*)	N	1	NC	30℃生长，而非 37℃
菲利军团菌(*L. feeleii*)	Y	2	NC	
吉斯特军团菌(*L. geestiana*)	N	1	NC	
高尔曼军团菌(*L. gormanii*)	Y	1	BW	AN：高尔曼荧光杆菌
格勒先军团菌(*L. gratiana*)	N	1	NC	
格雷乌军团菌(*L. gresilensis*)	N	1	YG	
海克尔军团菌(*L. hackeliae*)	Y	2	YG	
渣土军团菌(*L. impletisoli*)	N	1	NC	
以色列军团菌(*L. israelensis*)	N	1	NC	
詹姆斯顿军团菌(*L. jamestownensis*)	N	1	YG	
乔丹河军团菌(*L. jordanis*)	Y	1	YG	连续传代培养后变为部分半胱氨酸依赖
兰辛军团菌(*L. lansingensis*)	Y	1	NC	
伦敦军团菌(*L. londiniensis*)	Y	1	NC	
长滩军团菌(*L. longbeachae*)	Y	2	YG	
溶解军团菌(*L. lytica*)	Y	NK	BW	30℃生长，而非 37℃
马氏军团菌(*L. maceachernii*)	Y	1	YG	AN，梅氏塔特洛克菌
马赛军团菌(*L. massiliensis*)	N	1	NC	
米克戴德军团菌(*L. micdadei*)	Y	1	YG	AN，迈氏塔特洛克菌，匹兹堡军团菌
摩拉维克军团菌(*L. moravica*)	N	1	NC	
长崎军团菌(*L. nagasakiensis*)	Y	1	NC	连续传代培养后变为部分半胱氨酸依赖
水手军团菌(*L. nautarum*)	N	1	NC	
诺尔兰军团菌(*L. norrlandica*)	Y	1	NC	
橡岭军团菌(*L. oakridgensis*)	Y	1	YG	连续传代培养后变为部分半胱氨酸依赖
巴黎军团菌(*L. parisiensis*)	Y	1	BW	
嗜肺军团菌(*L. pneumophila*)	Y	16	YG	有3个亚种：弗雷塞里亚种、帕斯库利亚种、嗜肺亚种
奎特里拉军团菌(*L. quateirensis*)	N	1	NC	
昆兰军团菌(*L. quinlivanii*)	N	2	YG	
罗氏军团菌(*L.* rowbothamii)	N	1	BW	
红光军团菌(*L. rubrilucens*)	Y	1	R	
圣海伦军团菌(*L. sainthelensi*)	Y	2	YG	
圣克鲁斯军团菌(*L. santicrucis*)	N	1	YG	
莎士比亚军团菌(*L. shakespearei*)	N	1	NC	
斯皮里特湖军团菌(*L. spiritensis*)	N	2	YG	
斯蒂尔军团菌(*L. steelei*)	Y	1	Y/BW	可能只在人体定植而非致病，>35℃环境下不能生长
施泰格瓦特军团菌(*L. steigerwaltii*)	N	1	BW	
都灵军团菌(*L. taurinensis*)	N	1	R/YG	
图森军团菌(*L. tucsonensis*)	Y	1	BW	

（续 表）

军团菌种[a]	临床?[b]	血清型数[c]	长波紫外光下的颜色[d]	备注[e]
突尼斯军团菌（*L. tunisiensis*）	N	1	NC	
沃斯沃军团菌（*L. wadsworthii*）	Y	1	YG	
沃尔特斯军团菌（*L. waltersii*）	N	1	NC	
沃斯利军团菌（*L. worsleiensis*）	N	1	NC	
薮内军团菌（*L. yabuuchiae*）	N	1	NC	

注：[a] 可能存在一些尚未命名的菌种。[b] 是否分离自人类：是(Y)或否(N)。以前未从人类分离到的军团菌属仍有可能会感染免疫系统严重受损的患者。[c] 已认识的血清群(SG)种类。NK. 未知。[d] NC. 无色；BW. 亮蓝白色；YG. 浅黄绿色；BW/YG. 一些菌株呈亮蓝白色，一些菌株呈浅黄绿色；NK. 未知；Y/BW. 可扩散的嫩黄色，一些菌株菌落内还有亮蓝白色细胞；R. 深红色．R/YG. 大部分菌株为红色，其余的为黄绿色；wR. 淡红色。[e] AN. 别名。合格属名荧光杆菌属（*Fluoribacter*）和塔特洛克菌属（*Tatlockia*）未广泛使用

目前已有 500 多株嗜肺军团菌菌株完成了测序。序列分析发现，嗜肺军团菌包含许多真核细胞样基因，其中一些基因可通过改变正常的细胞学机制，使该菌获得更适合其生存的胞内环境[5]。通过对嗜肺军团菌基因组的分析发现：该菌种具有遗传多样性，且一些毒株在世界范围内播散[5]。编码脂多糖核心区及 O 侧链的基因主要存在于临床嗜肺军团菌血清 1 型株中，这可能是该血清型为 LD 主要致病菌的原因[5]。多个其他军团菌种的基因组测序业已完成，包括在已被报道的澳大利亚和新西兰常见的长滩军团菌[6]。目前，研究者已发现更多新的军团菌种，但尚未获得有效发表(validly published)。

二、军团菌简介

军团菌科是一个多样化群体，属于嗜常温、可运动、不分解糖类、专性需氧、营养要求高的革兰阴性菌(Gram-negative bacteria)。其生长需要 L-半胱氨酸，培养基中加入铁盐、支链脂肪酸和辅酶 Q 可促进其生长，而这在革兰阴性菌中并不常见[7]。嗜肺军团菌是研究最为广泛的一个种，相对来说，对其他军团菌知之甚少。几乎所有军团菌种都分离自水环境，而合格命名的 59 个种中，1/3 已从人和环境分离过。目前推测所有军团菌种的天然储库是水或土壤，人类只是该菌的偶然宿主。几乎所有军团菌种分离自环境中的水源，但长滩军团菌似乎更主要是一种土壤微生物，该菌含有帮助其在土壤昆虫和蠕虫体内定植或致病的基因[8]。环境中嗜肺军团菌是几种不同自生生活阿米巴[如棘阿米巴属(*Acanthamoeba*)和纳氏虫属]的兼性胞内寄生菌，这些阿米巴存在于生物膜或流水中的微生物群落中。

嗜肺军团菌可在 20～42℃ 范围内生长，而最适生长温度为 35～37℃。其他感染人的军团菌种可能具有更严格的生长温度，其中包括在高于 35℃ 时不能生长的斯蒂尔军团菌(*Legionella steelei*)和 LLAPs[9]。在固体培养基上培养时，增加湿度可促进其生长。2%～5% CO_2 的气体环境促进某些军团菌的生长。细菌的表型，包括免疫原性、大小和毒力，会因生长温度不同而有所改变[7]。

军团菌科体外生长需要的能量来源为氨基酸。除个别种外，所有已知军团菌种的原代分离都需要在培养基中加入 L-半胱氨酸后才能成功增殖。为达到最佳生长，需要在培养基中补充铁。培养基中加入 α-酮戊二酸(0.1%)可通过尚未明确的非营养机制促进嗜肺军团菌的生长。

很多因素可以抑制人工培养基上嗜肺军团菌的生长，包括高浓度 NaCl（100mmol/L，或 0.6%）、有毒的过氧化物、其他细菌或真菌的产物，以及某些脂质[7]。此外，该菌最适生长的 pH 范围很窄，为 6.7～6.9。固体培养基中含有活性炭和有机缓冲液，前者可用于清除有毒脂质和过氧化物，后者为吗啉丙磺酸(morpholinepropanesulfonic acid)或 *N*-(2-乙酰胺基)-2-氨基乙磺酸[*N*-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid]用以降低钠的含量并提供所需的 pH。军团菌属(*Legionella*)培养基的制备非常复杂，最好由有实力的商业公司或专业实验室来制作。

三、流行病学、传播途径及致病机制

LD首次被认为是一个独立疾病始于1976年7月在宾州费城由宾夕法尼亚州退伍军人协会召开的一次会议，此次会议期间及其后出现了流行性肺炎，病死率高达15%[10-11]。CDC的Joseph McDade及其同事确定一种新的革兰阴性菌是导致此次暴发的病原[12]。但后经证实，这个病和这个菌都不是新发现。首次以LD名称描述的暴发出现于1957年[13]，而这种细菌自20世纪40年代也多次分离出来。

环境研究发现该菌在自然界水体中广泛存在，偶尔以高浓度出现在管道系统、热水器、温泉浴场、冷却塔等暖水中。很多军团菌种在自然界中存在于自生生活阿米巴体内，这使得这些苛养菌既可以在阿米巴体内增殖，又能避免接触杀菌剂[14]。在生物膜内微生物形成的复杂群体中，常发现军团菌感染的阿米巴。虽然该菌在自由流动的冷水和经杀虫剂处理的水中浓度很低，但是它在温暖，尤其是死水中能够增殖。那些含污染水的雾化装置可以播散该菌。与之相反，长滩军团菌感染主要通过土壤暴露获得，尤其是某些盆栽土[15]。

嗜肺军团菌血清1型导致了95%～98%的社区获得性LD。在该血清型临床分离株中，80%～90%为庞蒂亚克/单克隆抗体(MAb)3-1亚型。嗜肺军团菌血清1型、庞蒂亚克亚型中，仅几个克隆型即引起了50%散发的社区获得性感染[16]。主要见于临床的血清1型嗜肺军团菌在环境中并不常见，而大多数环境中常见的嗜肺军团菌很少引起LD[16-17]。血清1型庞蒂亚克亚型嗜肺军团菌在医院获得性LD中并不常见，尤其在免疫功能低下的患者中更为少见。高达60%的医院获得性LD可能是由嗜肺军团菌血清1型的其他亚型、其他血清群，甚至其他军团菌种所致[18-19]。

尽管吸入微生物可能是一种致病机制，人类感染主要还是通过吸入污染水体产生的气溶胶引起[10]。LD社区流行多源于军团菌污染的冷却塔和其他产生气溶胶的装置。污染的饮水系统，如加热器、暖水管也可能是该病发生的主要原因，但这种来源的菌通常不引起急剧暴发，而引起更持久和缓慢发展的暴发。两者中任何一种方式均可引起散发LD。

尽管军团菌在我们周围的环境中普遍存在，但是LD并不是肺炎的常见病因。需住院治疗的成人肺炎中，有0.5%～5%为LD。在美国，被动上报数据表明，该病的发病率为每年每百万人4～20例，而一项前瞻性研究估计该病的发病率约为每年每百万人80例，或者说，每年有8000～18 000例LD[20]。这一发病率可能被低估了，因为德国近期报道的发病率为每年每百万人180～360例[21]，这几乎占全部社区获得性肺炎(而不仅仅是住院肺炎患者)的4%。在美国和其他地方，未能对LD进行全面诊断的现象很常见，2016年仅有5300例LD病例上报给美国CDC；诊断不足是因为临床上很少开医嘱进行相关实验室检查，同时实验室诊断方法又缺乏敏感性[22]。散发性社区获得性LD比暴发性病例更为多见，在美国，只有约4%的病例与聚集性发病有关[23]。大约20%的LD与旅行相关，在外过夜旅行是该病的危险因素之一。LD全年均可发生，季节高峰在温暖月份(春末至秋初)；美国和欧洲的患者中，约60%发生于6—10月[23-24]。

据估计，LD的潜伏期为2～14天，中位数约为4天。对一次大暴发的研究发现，潜伏期可长达19天，中位数为7天[25]。美国公共卫生部门采用的LD流行病例定义可在网上查询(https://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/legionellosis/case-definition/2005/，http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/? uri = CELEX: 32012D0506&qid = 1428573336660&from = EN # page = 17)。

嗜肺军团菌通过感染人的单核细胞，主要是肺泡巨噬细胞而致病。细菌吸入肺以后，侵入肺泡巨噬细胞，并在胞内增殖。嗜肺军团菌的分子和细胞的致病机制已有详细的研究，但对非长滩军团菌的其他军团菌种的致病机制知之甚少。嗜肺军团菌一旦接触吞噬细胞，便通过Ⅳ型分泌系统注入数以百计致病性的效应分子。缺少这种Ⅳ型分泌系统(称为Dot或Icm)的细菌没有毒力。通常宿主细胞在融合的吞噬溶酶体内杀死细菌，而注入的效应分子阻止了此正常的防御反应。取而代之的是，这些有毒力的细菌驻留于与宿主核糖体相关的非融合吞噬体中，不仅不被杀死，还从细胞中汲取营养，并在特殊的吞噬体中增殖。当

增殖数千代后，细菌致细胞死亡。与此同时，细菌表型发生改变，变成很活跃、小的形态，并整装待发以侵入邻近未感染的巨噬细胞。该菌还具有其他分泌系统，通过这些系统可以分泌多种蛋白酶和其他潜在毒性物质，其中很多物质具有促炎或致组织损伤的作用。胞内铁的获得对细菌在细胞内生存和生长非常重要；很多细菌性的效应分子帮助细菌获取铁。宿主对细菌及其分泌的毒性物质产生强烈的炎症反应，这些反应损伤了宿主的肺部组织。宿主主要通过固有免疫系统和获得性细胞免疫遏制细菌。有关发病机制的详细描述可查阅文献[26]。

四、临床意义

LD是由嗜肺军团菌（*Legionella pneumophila*）和其他军团菌种引起的一类细菌性肺炎。该型肺炎临床表现可轻可重，甚至致死，平均病死率为12%[26]。该病的主要危险因素包括内源性或外源性细胞免疫系统抑制、吸烟、夜间旅行、使用井水、慢性心脏或肺部疾病和慢性肾衰竭。LD的高危患者人群包括：大剂量使用糖皮质激素的患者、实体器官移植患者、因各类自身免疫病而接受抗肿瘤坏死因子治疗的患者[26]。

无法通过临床表现、X线或非特异实验室检查将LD和其他社区获得性肺炎鉴别开来[10]。研究者多次尝试建立临床评分系统把LD同其他肺炎鉴别出来，但均告失败。肺炎的严重程度、基础疾病和特定抗生素使用的及时性是影响预后的重要因素。无其他健康问题的LD患者若能得到及时治疗，治愈率可达95%～99%。既往体健的LD患者，未经治疗其病死率约为15%，而重度免疫功能抑制患者则可高达75%[26]。

由于缺乏前瞻性、随机对照、大样本研究来确定LD的最佳治疗方案，因此很多依据源于实验室组织培养和动物模型研究，以及非随机研究的结果[26]。对于门诊免疫功能正常的轻症LD患者，红霉素（erythromycin）、克拉霉素（clarithromycin）、阿奇霉素（azithromycin）、四环素（tetracycline）或多西环素（doxycycline）、左氧氟沙星（levofloxacin）、环丙沙星（ciprofloxacin）和莫西沙星（moxifloxacin）治疗效果基本相当[26]。重症和免疫功能不全的患者应选用喹诺酮类（quinolone）抗菌药物（尤其是左氧氟沙星）和阿奇霉素[26]。有时使用两种或两种以上的抗生素，但是获益存有疑问，还可能有害[26-27]。

庞蒂亚克热（Pontiac fever）是一种急性流感样疾病，与暴露于含军团菌的环境气溶胶有关[26]。该病的病原学和致病机制尚未阐明，但很可能此病是由吸入细菌毒素（如内毒素）所致，或可能发生了针对细菌的急性变态反应。因为引起庞蒂亚克热的气溶胶中存在多种微生物和内毒素，所以军团菌是否是全部病例的致病原因还不清楚。庞蒂亚克热是一种自限性疾病，未见死亡病例报道，且几乎不需住院治疗，也不需要使用抗生素。

五、标本采集、保存和转运

咳痰标本和其他下呼吸道标本是军团菌最常见的来源，其次为胸腔积液和血液，但并不实用。罕见来源包括心包积液（pericardial effusion）和源于肾、肝、脾、心肌、鼻窦、皮肤软组织、感染伤口、腹水、人工或自体心脏瓣膜、关节液、骨髓及肠腔的标本。可获得的痰标本、支气管镜检（bronchoscopy）标本、肺活检标本和胸腔积液培养应该作为诊断LD的实验室常规检查。肺活检标本虽然阳性率最高，但也可能为阴性。咳痰或其他下呼吸道分泌物标本培养的阳性率仅次于肺活检标本，应最适宜进行军团菌感染的检查。对培养来说，咳出的高质量痰标本，尤其是气管内吸取物通常优于支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid）。LD住院患者如果在特效抗生素治疗之前采集痰标本，当采用最佳培养方法时大约80%可获得阳性结果。胸腔积液阳性率低（<10%），但如能获得，就应培养。其他标本类型没有必要进行军团菌培养，除非临床上高度怀疑该病影响到这些部位，或有其他部位的特异性实验室证据。

LD患者产生脓液和分泌物均有限，因此痰标本镜检评分标准不能用来决定是否进行军团菌培养。如果基于痰有脓性才处理的标准，可能会有高达80%的军团菌培养阳性标本因不合格而拒收[28]。

抗原检测（antigen detection）的尿标本应用无菌容器收集[29]。虽然硼酸可以保护抗原，但是尚无对含有硼酸和甲酸钠的商业化尿转运系统抗原保护性和避免相互作用的相关研究。若预期标本

送达延迟时间不超过几小时，则可常温转运尿标本到实验室。转运时间过长则需冷藏标本；冷冻（－70～－20℃）尿标本，其抗原可稳定数月至数十年。

检测血清抗体的血标本使用标准管收集，并在室温下转运[30]。室温下存放数天的未分离的凝血标本，检测效能不会受到负面影响。为了进行平行检验，可分装标本长期保存于－20℃，这样可以避免反复解冻而降低抗体浓度。军团菌生命力强，在临床标本中通常能存活长达1周。痰和其他呼吸道标本（包括肺活检标本）应使用无菌容器收集，并在常温下迅速转送到实验室。如果数小时后才能接种，则应在2～5℃环境下转运和储存标本。长期保存最好置于－70℃，虽然这样可能会使细菌浓度降到检测水平以下，特别是当标本以水样为主或菌量初始浓度很低时。反复冻融对细菌有害。一些组织（尤其是脾）含有生长抑制物质，这样的标本必须立即接种；即使2～5℃环境中过夜储存也会明显降低培养阳性率（需注意：肺标本并非如此）。

尚未见临床标本中军团菌DNA稳定性的有效数据。不管怎样，单独用于军团菌核酸扩增试验（nucleic acid amplification test，NAAT）鉴定的呼吸道和血清标本似乎不需要特殊的运送条件。不同类型的标本转运和检测前储存的一般原则可参见本手册第19章。

六、直接检测

1. 显微镜检查 肺组织和痰中的嗜肺军团菌为短小球杆或短杆菌，长度3～5 μm（图51-1）。这与采自培养基上的细菌形态大不相同，后者通常呈长10～25 μm的纤细杆菌。革兰染色很难发现痰和肺组织活检标本中的嗜肺军团菌。使用0.1%的碱性品红代替番红可大大增强培养皿上的军团菌的着色，但即便使用该染色方法，也很难查见痰或组织中的细菌。使用碱性品红进行革兰染色（Gram stain），肺组织和痰中的嗜肺军团菌能查到的不足0.1%。人体组织中嗜肺军团菌为胞内寄生，形态很小，革兰染色很难查见菌体；痰和组织中存在蛋白质类物质，染色剂会被周边这些物质摄取而造成检测困难。

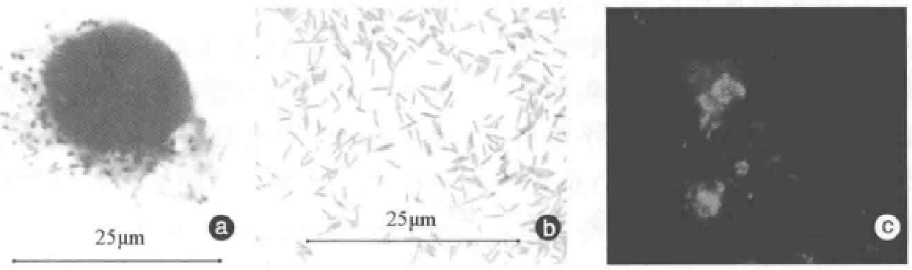


图51-1　嗜肺军团菌的镜下照片

注：a. 肺部感染患者胞内菌的吉梅内染色法（Gimenez stain）；b. BCYEα培养基上的细菌经碱性品红复染的革兰染色，注意胞内菌和胞外菌在细菌大小和形态方面的显著差异；c. 肺组织中嗜肺军团菌（*Legionella pneumophila*）直接免疫荧光染色，见彩插

银沉淀染色，如Warthin-Starry染色及其改良法、Dieterle染色法，能增强细菌的着色[31]，这是一种早期检测包埋组织和痰中嗜肺军团菌的方法。这些银染法可有效检测包埋组织中的细菌，但不能很好地检测痰和其他非包埋组织标本的军团菌。银染法敏感性不高，可能产生伪影。为了改善其敏感性和特异性，需要专业技术人员来操作和解读。

有些军团菌，尤其是米克戴德军团菌（*Legionella micdadei*），可能需要用到抗酸染色方法，新鲜标本和福尔马林（formalin）固定标本都可以[32]。此时抗酸菌不是分枝杆菌，而呈微小的球杆菌，提示可能为军团菌。

免疫荧光显微镜检查是检测组织和痰中嗜肺军团菌的最敏感和最特异的镜检方法（图51-1）[33]。为达到最优敏感性和特异性，需要正确的染色方法和非常专业的显微镜专家。即使操作良好，该方法的敏感性仍低于其他诊断方法。基于上述原因，目前很少使用该方法直接检测，除非是尸体解剖的肺标本。

2. 抗原检测 血清1型嗜肺军团菌引起的LD常通过检测细菌尿抗原进行诊断[29]。已有几种以此为目的的商品化免疫方法可供使用，其中最方便的是一种快速单项免疫层析法卡片试验。目前至少6家公司可以生产免疫层析法检测卡，其中三家公司通过了FDA的认证(Alere，BinaxNOW；SA Scientific，SAS Legionella；Meridian，TRU Legionella)；其中只有BinaxNOW试验得到广泛评估。其他几种试验使用的都是微管酶免疫分析法。所有这些方法的优点在于其针对血清1型尤其是庞蒂亚克/MAb 2/MAb3-1单克隆亚型嗜肺军团菌引起的感染[29]。免疫层析卡片法的敏感性较微管酶免疫分析法低40%[34]，尽管有研究通过延长孵育时间和浓缩尿提高卡片检测的敏感性[35]；但是在厂家说明书中均未提及这两种优化方法。免疫层析卡片法能快速检测单一样本，且使用方便和稳定性高，这些弥补了其敏感性低的缺点。

所有方法的临床检测性能都取决于预测血清1型嗜肺军团菌及其庞蒂亚克单克隆亚型感染的可能性[29]。这些方法能够检测出60%～70%的血清1型庞蒂亚克单克隆亚型流行性感染，以及高达90%的该亚型引起的散发肺炎病例。针对相同的细菌亚型，检测敏感性的差异可能由疾病严重度所致，而这是决定检测敏感性的另一个重要因素。患有严重血清1型嗜肺军团菌的LD患者，例如需要重症特别护理和呼吸机辅助支持的患者，尿抗原检测阳性的可能性最大，在这样的人群中，检测庞蒂亚克单克隆亚型感染的敏感性可能达到90%～95%。而另一方面，尿检只能检出约50%的相同单克隆亚型引起的门诊轻症感染者。此法可能检测出40%的血清1型其他亚型军团菌感染的住院患者，也可检出低于5%～40%的其他血清型或种的感染者[29]。此检测在起病第一天可能阴性，但是对于重症患者，一般入院时可能即为阳性。起始检查为阴性的患者，起病2～3天后复查，可查出少量患者。

使用超滤装置，如Amicon浓缩器(Millipore，Billerica，MA)浓缩标本可以提高检查的敏感性。一些研究表明，该方法可提高敏感性30%左右，同时不影响特异性[29]。BinaxNOW试验的孵育时间延长到60 min也可提高敏感性而不降低特异性[29]。如果标本冻存数月之后再检测，敏感性会降低[29]。

尿抗原检测特异性非常高，为99%～99.9%。含有类风湿因子的尿、冻融尿及尿中沉淀物过多均可能造成假阳性结果。上述诸多因素引起的假阳性在全部阳性结果中占比仅为1%(P. Edelstein未发表资料)。无论怎样，所有阳性结果均应通过标本煮沸、离心分离后再次确认；这些操作能够提高检查的特异性，但检测说明书中并未提及。LD患者成功治愈后数天至数月，其尿中仍可排出达到检测水平的抗原，而最可能出现持续数周到数月阳性的，是那些患广泛肺炎而治愈的患者。持久地排泄尿抗原并不代表治疗失败。

3. 核酸检测 参考和研究实验室已成功地应用核酸检测技术检测痰、尿和血标本中军团菌，其中对嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)检测方法的研究最为深入。最佳结果显示分子诊断较培养方法更为敏感[36]。据估计，分子技术检测下呼吸道分泌物和血清标本的敏感性分别为80%～100%和30%～50%，特异性>90%[36]。痰消化处理对提高检出率、消除PCR抑制物非常重要[37]。作者实验室提取DNA前使用蛋白酶K消化痰并高速混匀。

传统PCR和实时PCR方法均可用来检测军团菌[38-39]。大多数实验室将巨噬细胞感染蛋白基因(*mip*)作为靶基因来检测嗜肺军团菌。最常用于检测军团菌属的靶基因为rRNA(通常使用16S rRNA，尽管据称23S rRNA具有优势)[40]。近期的研究表明，*wzm*基因可用来特异性地检测血清1型嗜肺军团菌[41]。有研究者开发出用于检测临床标本、敏感且特异的一种多重分析方法，其靶标包括血清1型嗜肺军团菌(*wzm*)、嗜肺军团菌(*mip*)和军团菌属(*Legionella*)(*ssrA*)[42]。因相对单一PCR而言，多重分析没有劣势而最为常用，尽管也有项研究显示基于核酸序列扩增(nucleic acid sequence-based amplification)的单一PCR比多重设计更具优越性[43-44]。对于免疫缺陷患者的实验室检测标本，应同时检测嗜肺军团菌和其他种的军团菌，因为在这一群体中，相当一部分LD患者并非由嗜肺军团菌所致。公共卫生实验室会为了能快速检测出血清1型嗜肺军团菌，倾向选择2个或3个靶标[42,45]。通常可直接在原始标本中进行嗜肺军团菌的分子分型，这在暴发调查中非常有用。在长滩军团菌(*Legionel-*

la longbeachae)感染常见地区，NAAT可直接从临床标本中检出该病原。

美国还没有FDA批准的商品化NAAT方法。其他地区上市的几种商品化NAAT方法可用于检测呼吸道标本，但还未见公开的全面评估这些商品化方法的资料。临床使用前，需进行广泛的评估[47]。欧洲对于NAAT方法的外部质量评价方案可在网上查询(https://www.instand-ev.de/en/eqas/eqa-program.html)。

在尿抗原检测基础上采用核酸扩增试验检测痰中军团菌，没有明显的更多获益，它仅比单独尿抗原多检测出11%。原因可能是社区获得性疾病中以血清1型嗜肺军团菌、庞蒂亚克亚型为主[48]。因为尿抗原检测免疫缺陷人群的敏感性较低，对于院内获得性LD患者和伴有免疫抑制的LD患者，核酸检测的性能可能明显优于尿抗原检测。

过去，分子方法检测临床标本中的军团菌存在一个问题，就是不能对检测到的细菌进行流行病学分型。现在可以通过巢式PCR方法，对于大部分PCR阳性标本进行分型[46]。引物和详细步骤可上网获取(http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)。

因为军团菌常见于水中，所以应注意几乎每种分子试剂都可能受到军团菌核酸的污染。已报道商品化的"纯"水或核酸提取柱污染可导致军团菌NAAT检测出现假阳性结果[48-49]。因为假阳性产物进行测序也能得到军团菌种的序列，所以不能通过对产物测序来排除污染并将其归为某种军团菌的可能。如果是提取柱污染，可能同批次中只有少数、而不是全部受到污染。这就意味着为了确保特异性需要设置多个阴性对照，包括提取对照和无模板对照。更换试剂或使用特定的DNA提取器有助于减少外来污染[48]。假阳性通常由于少量的试剂污染引起，减少扩增循环数可能会减少假阳性[48]。另外，还要注意含有军团菌的自来水污染标本的问题，文献曾报道由此造成的支气管镜相关LD的假暴发(pseudo-outbreak)，这些假暴发同时基于培养和DNA的检测结果[50]。

七、分离程序

1. 标本处理　要从临床标本中最大程度分离出军团菌，需要：①稀释标本用以降低组织和血清中的抑制因子和抗生素；②预处理标本以减少微生物污染；③使用多种选择培养基和非选择培养基(表51-2)。实践中，要求将肉汤或水稀释的标本接种到一种非选择性培养基和两种选择性培养基，并且将酸缓冲液稀释的标本接种到上述3种平板上，共计6个培养皿。正常无菌体液和组织，如胸腔积液、无菌采集的肺组织或血标本用于培养时，不必使用多种选择培养基和去污染处理，也常可成功分离出军团菌。

表51-2　临床和环境标本培养军团菌所用培养基的组成及其选择性[a]

培养基	别名	选择性添加剂	主要用途	选择性[b]
BCYEα	CYE	无	临床标本、传代培养	无
BMPA	PAC	头孢孟多、多黏菌素B(polymyxin B)、抗真菌药	临床标本、环境标本	上呼吸道正常菌群：3+；肠道菌群：3+；酵母菌：3+；霉菌：1+；军团菌属：1+～4+
PAV	VAP	万古霉素(vancomycin)、多黏菌素B、抗真菌药	临床标本、环境标本	上呼吸道正常菌群：2+；肠道菌群：2+；酵母菌：3+；霉菌：1+；军团菌属：1+
MWY	VGP	万古霉素、多黏菌素B、抗真菌药、甘氨酸	环境标本	上呼吸道正常菌群：2+；肠道菌群：2+；酵母菌：3+；霉菌：1+；环境菌：2+；军团菌属：1+
CCVC		头孢菌素(cephalosporin)、多黏菌素E、万古霉素、放线菌酮(cycloheximide)	环境标本	上呼吸道正常菌群：+；肠道菌群：3+；酵母菌：2+；霉菌：2+；军团菌属：1+～4+
BCYEα-L		无(不含L-半胱氨酸)	细菌鉴定	军团菌属：4+(军团菌属在该培养基上不能生长)

注：[a]BMPA. 加入抗生素的BCYEα培养基；PAV. 多黏菌素B、茴香霉素和万古霉素；MWY. 改良的Wadowsky Yee培养基；CCVC. 含头孢菌素、黏菌素、万古霉素和环己胺的BCYEα培养基。[b]选择性等级从0到4+。0：添加剂不能抑制这些微生物；1+：添加剂轻微抑制(约75%可以生长)；2+：25%～50%可以生长；3+：约10%可以生长；4+：可以生长者低于1%

胰酶大豆肉汤(tryptic soy broth)或蒸馏水稀释(1:10)会增加大部分标本培养的检出率,包括痰和其他液态呼吸道标本、肺组织、淋巴结、脾,以及其他可能的器官,如肝和肾。痰和其他呼吸道标本应首先置于培养皿中检视,挑出脓样物质进行培养。组织(约 1 g)标本应加入少量肉汤(1 ml)进行研磨,该量的肉汤足够稀释除脾之外的大部分组织;为达到最佳的细菌培养效果,脾组织要按 1:10 再稀释。液体标本经涡旋混匀后,取大约 0.1 ml 加到 0.9 ml 的稀释肉汤即可。胸腔积液、关节液和血培养瓶中的血标本传代培养时,接种平皿前不需要进行稀释;实际上,胸腔积液经离心浓缩后军团菌的检出会增多。

大部分痰和其他呼吸道分泌物标本需去污染处理以减少微生物污染。即采用低 pH KCl-HCl (pH 2.2)缓冲液按 1:10 稀释标本,室温温育(4 min)后将悬液接种到培养基。这个环节处理的时间非常关键,如果仅少了 1 min 也会导致检出减少。培养基要有充分的缓冲容量,才能中和接种的酸化标本。酸化标本的替代方案是将标本加热至 50℃持续 30 min。大部分无菌收集的组织标本不需要进行去污染处理,尽管肺组织偶尔含有多种污染的细菌和真菌。这种情况下,将组织在无菌蒸馏水中研磨,然后加热或酸化处理可能会有所帮助;有时还需稀释研磨组织以提高检出率,是否预处理均可。对于侧重于流行病学目的的标本,有时可以通过以下方法提高检出:标本进行多次的 10 倍稀释后接种到各种不同的培养基上;采用不同标本处理方法,如加热和酸化;标本与阿米巴共培养[51-52]。

2. 接种平皿 每个培养皿上接种约 0.1 ml 标本,大概约占 1/4 区域。尚无研究比较画线分离和均匀涂布整个平皿中哪个效果更好。孵育前应待培养皿彻底变干,这有助于吸收相对大量的接种液,也可防止污染物扩散至整个培养皿。

3. 培养基 通常使用添加 0.1% α-酮戊二酸的缓冲活性炭酵母琼脂培养基(BCYEα)分离和培养军团菌。不推荐临床使用非 α-酮戊二酸的 BCYE 培养基,因为这种氨基酸能够大大促进细菌生长[53]。

BCYEα 培养基中添加抗菌药物而具有了选择性(表 51-2)。多种抗真菌药物均可用于该培养基。放线菌酮因不能抑制白念珠菌的生长,故不适合加入临床标本用的培养基中。茴香霉素(anisomycin)和纳他霉素(natamycin)较放线菌酮能抑制更多的酵母菌。之所以设置一组培养基,是因为没有任何一种选择培养基能满足所有要求。从临床标本中检出军团菌的理想方案需要 3 种不同的培养基:一种非选择性培养基(BCYEα)和两种选择性培养基[加抗菌药物的 BCYEα 培养基和加多黏菌素 B、茴香霉素和万古霉素的 BCYE 培养基。BMPA 对绝大多数嗜肺军团菌菌株来说都是优秀的选择性培养基,但培养基含有的头孢羟唑会抑制一些其他军团菌的生长,偶尔也会抑制嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)菌株。使用选择性稍弱的 PAV 培养基可以让其他军团菌种生长良好,但不利于嗜肺军团菌。由于没有哪种选择性培养基可以抑制多重耐药的革兰阴性菌,因此这降低了医院内感染中军团菌的检出。

使用选择和非选择培养基能够理想地分离出嗜肺军团菌,但分离其他军团菌的效果尚无确切资料描述。一项研究显示,BCYEα 培养基中加入 1%的牛血清白蛋白能提高从豚鼠脾标本中检出米克戴德军团菌(*Legionella micdadei*);由于脾组织对生长抑制的削弱而促进了细菌的生长[54]。含牛血清白蛋白的 BCYEα 培养基能否提高人肺组织或痰标本中米克戴德军团菌的检出尚未可知,但很可能不会提高其检出。有报道称含有纳他霉素、氨曲南和万古霉素的选择性 BCYEα 培养基有利于从土壤中分离长滩军团菌(*Legionella longbeachae*)[55]。

非选择培养皿和斜面培养基的效期约 1 年[56]。长效期需要保证平皿的厚度(注入 25 ml),并在平皿表面彻底晾干后用塑料袋密封,避光储存于 2~4℃。选择培养基储存约 3 个月后失去其选择性,但这取决于加入的抗生素,一些培养基可能保存较长时间。

使用培养基之前需对其进行质控检测。当前的 CLSI 标准不能满足这些培养基的质控(quality control,QC)检测的要求。约 1%的商品化培养基不能通过实验室的质控检测(个人观察数据)。CLSI QC 检测方案是:大量接种培养基适应性军团菌菌株(medium-adapted *Legionella* species strains)并采用生长与否来判断培养基的性能。嗜肺军团菌 ATCC 33152 已具有培养基适应性,

可在通常不支持军团菌生长的培养基上生长。由于培养基在制备过程中会产生轻微的变化，比如盐添加过多、高压灭菌时间过长、缓冲液劣化，这些都可能明显影响培养基上野生菌株的生长，但不会影响培养基适应性菌株的生长。培养基QC检测的最佳方法是将数百个非人工培养基传代(non-artificial-medium-passaged)的嗜肺军团菌(可从感染豚鼠的肺获得)接种待检培养基，孵育3～4天后进行菌落计数。在缺少肺传代嗜肺军团菌的情况下，应该使用传代少的临床菌株，一定注意的是：每个培养皿上只接种几百个细菌。选择性培养基是否具有非军团菌的抑制性能，其QC检测可以通过接种相对抗生素敏感的大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌来评估，如ATCC25922和25923，这些细菌的生长在选择性培养基上应受到明显的抑制。

4. 培养基的孵育 接种后的培养基置于35～37℃的湿润空气中孵育。不论使用哪种加湿方法，必须保证孵箱或培养罐清洁，定期对容器或孵箱进行消毒灭菌。供给少量的CO_2(2%～5%)能够促进一些苛养军团菌的生长，如圣海伦军团菌(*Legionella sainthelensi*)和橡岭军团菌(*Legionella oakridgensis*)。低浓度的CO_2不会损害嗜肺军团菌的生长，但是CO_2浓度高于5%则会抑制细菌生长。因为更强嗜二氧化碳的种在人类分离株中非常罕见，所以很多实验室不使用二氧化碳环境孵育军团菌培养基。

5. 检视平皿 军团菌一般孵育3天后开始出现菌落。孵育5天平皿才出现菌落的情况非常少见。一些极少分离的军团菌种可能需要孵育14天才能长出菌落。不管怎样，应在培养的第1～5天和第14天检视培养平皿。

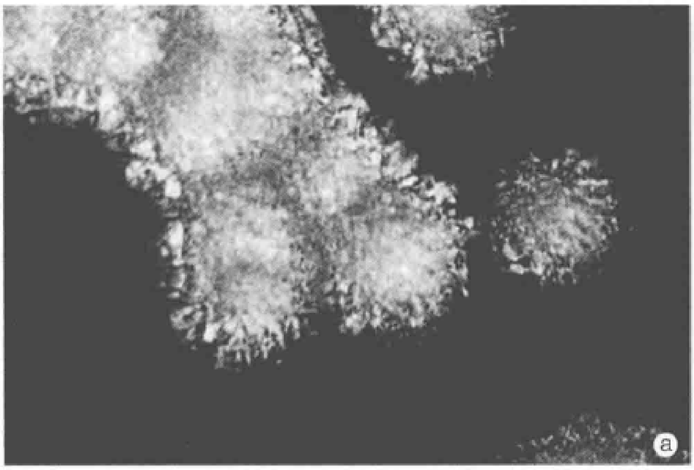
如果仔细记录孵育后第1天和第2天菌落出现的情况，就会发现军团菌在培养皿上出现得晚可视为一个极大的优点。孵育2天后出现的新菌落应考虑是某种军团菌。非常罕见的情况是自严重感染的肺部(通常源于未经治疗的死亡病例尸检)，培养军团菌时可能在第2天出现菌落。所以对于尸解肺培养病例，在一定范围内要灵活地推测生长速度。临床标本中的军团菌从来不会在培养的第1天就长出菌落，这是从军团菌菌落中识别铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的一个关键点，因为非常早期的军团菌菌落外观上很像铜绿假单胞菌。

正确观察培养皿需要解剖显微镜，光线以约30°角直射培养皿表面。不使用解剖显微镜或者光源使用不当会遗漏一些阳性培养，尤其平皿中有其他细菌混杂生长时。此外，很早期的军团菌菌落非常细小，裸眼很难发现。因此，使用解剖显微镜发现菌落的时间可提前近1天。军团菌菌落几乎都出现在画线的第一区，有时出现在培养皿的边缘。

军团菌种的菌落大小和形态会随时间而变化。非常早期的菌落(3天)扁平、完整、直径0.5～1.0 mm，当用解剖显微镜在入射可见光时观察，通常有蓝色(看起来像一个呈云状中心的冰块)、蓝-绿色或红色斑点。继续孵育6～24 h，变为光滑的、凸起的、色彩斑斓的完整菌落，直径1～3 mm，解剖显微镜观察呈“猫眼石”样(图51-2)。将接种环插进军团菌菌落，取出时会形成一条粗的黏丝。与几种易混淆的细菌不同，军团菌菌落边缘与中心部位稠度相同，且不潮湿或透明。再继续孵育1～2天，菌落大小可增至5～7 mm，变成有突起的，有时伴随瘤状或不均一的质地，并且形成扩张性边缘，这个阶段色彩斑斓的特征可能丢失。晚期菌落最难与非军团菌区分，所以每天检视培养皿对于正确鉴定至关重要。有些军团菌菌落形态不会因持续孵育而发生变化，但这种情况极少见。

军团菌培养需采取生物安全2级措施。在通风良好的实验室开放工作台上检视军团菌种培养皿、选取典型菌落和传代培养是安全的。使用开放操作台在载玻片上制备细菌混悬液进行革兰染色也是安全的。但是，涡流悬液制备、声波降解、组织研磨、初代接种及可能产生高浓度气溶胶的操作均应使用生物安全柜(biosafety cabinets)。还未见确凿证据的实验室获得性LD病例报道。

6. 疑似菌落和相似细菌的初步鉴定 疑似军团菌的菌落应首先进行革兰染色(Gram stain)，以确定细菌为小的、有时纤细的革兰阴性杆菌。取少量菌落用灭菌水或盐水在玻片上制备悬液。因为没有散开的细菌团块可能会染成革兰阳性杆菌，因此将细菌完全混悬于液体中非常重要。使用0.1%的碱性品红进行复染也很关键，而这些细菌对番红着色非常差。根据菌落培养时间、菌株和种，取自培养皿的军团菌大小可能是从0.5 μm×5 μm的短杆菌到1 μm×25 μm的长丝状菌。



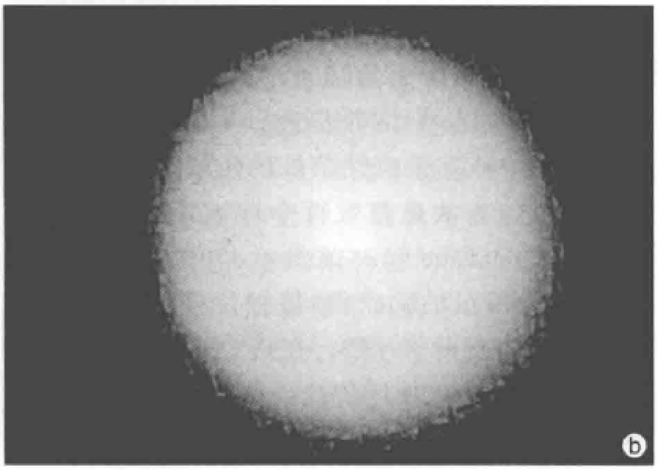


图 51-2 BCYEα 琼脂培养的嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)菌落照片。注意里面的斑点,并可看到不同颜色,有时出现于同一培养基,见彩插

然后,应将革兰阴性菌接种于两种不同的培养基:BCYEα 和大豆胰蛋白酶血琼脂培养基(tryptic soy blood agar,TSBA)或不含 L-半胱氨酸的 BCYEα 培养基(BCYEα-L),应取近似同等菌量接种在一小区域内(1 cm^2);如需要,每个培养皿可以接种 8 个或更多分离株(图 51-3)。应挑取相当大量的菌落接种上述培养基,以确保孵育 16~18h 后细菌可以生长,这是因为如像其他细菌那样接种少量,则军团菌需数天才能在培养基上长出肉眼可见的菌落。如果只有一个小菌落,可以使用少量(约 0.5 ml)灭菌水(而不是盐水)将其制成菌液进行染色、转种和血清鉴定。军团菌在 BCYEα 培养基上孵育 16~36 h 即可生长,而在 TSBA 和 BCYEα-L 培养基上却不能生长,这是利用了军团菌生长依赖 L-半胱氨酸的特性。有时,军团菌在 TSBA 或 BCYEα-L 培养基上也能少量生长,但最多仅能达到 BCYEα 上 10%的细菌生长水平。自原代分离平皿的营养携带(nutrient carryover)可以解释这种微弱生长;将 BCYEα-L 或 TSBA 上生长细菌再转种至相同培养基可以证明这一点。罕见的几个军团菌经连续传代后,部分失去对 L-半胱氨酸的生长依赖性,但即使这样,它们在 BCYEα-L 上的生长也弱于 BCYEα;这些菌种包括长崎军团菌(*Legionella nagasakiensis*)、橡岭军团菌(*Legionella oakridgensis*)和乔丹河军团菌(*Legionella jordanis*),它们中无一引起两例以上 LD 的病例。TSBA 在检测临床分离株 L-半胱氨酸生长依赖性上几乎与 BCYEα-L 相当,且可能更便宜,而这取决于每个培养基检测的菌株数。含血琼脂培养基(非 BCYEα-L)用作筛查 L-半胱氨酸依赖性的时,特别要注意的是培养基的基础不能太丰富。例如,布鲁菌血琼脂(*Brucella* blood agar)支持嗜肺军团菌生长几乎与 BCYEα 一样好,其他含血培养基表现也一样[57]。培养基在 35~37℃环境中过夜孵育或直到 BCYEα 平皿上有肉眼可见的生长。比较平皿上细菌生长的相对数量以确定 L-半胱氨酸依赖性。当呈纯生长时,大部分军团菌产生一种特殊的发霉气味,这对训练有素的操作者来说,此气味非常有特征性。

BCYEα 平皿上常见的容易与军团菌菌落混淆的细菌包括侵蚀艾肯菌(*Eikenella corrodens*)、铜绿假单胞菌、黄杆菌属(*Flavobacterium* spp.)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* spp.)和一些芽胞杆菌属。所有这些细菌在 BCYEα-L 和 BCYEα 培养基上生长得同样好,但这些细菌在 BCYEα 上生长早期呈斑点的菌落。土拉热弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)在 BCYEα 琼脂上生长良好,而菌落不像军团菌。土拉热弗朗西斯菌是除军团菌外仅有的 L-半胱氨酸依赖性革兰阴性菌。其菌落无斑点,不透明,外观均一。另一容易混淆点在于有些军团菌血清分型试剂与土拉热弗朗西斯菌存在交叉反应。曾有报道将土拉热弗朗西斯菌误鉴定为嗜肺军团菌[58]。当疑诊兔热病时,需要采取更严厉的安全措施。值得注意的是,一些类芽胞杆菌可染为革兰阴性杆菌,芽胞不明显,在 TSBA 培养基上不生长(但在 BCYEα-L 上生长),

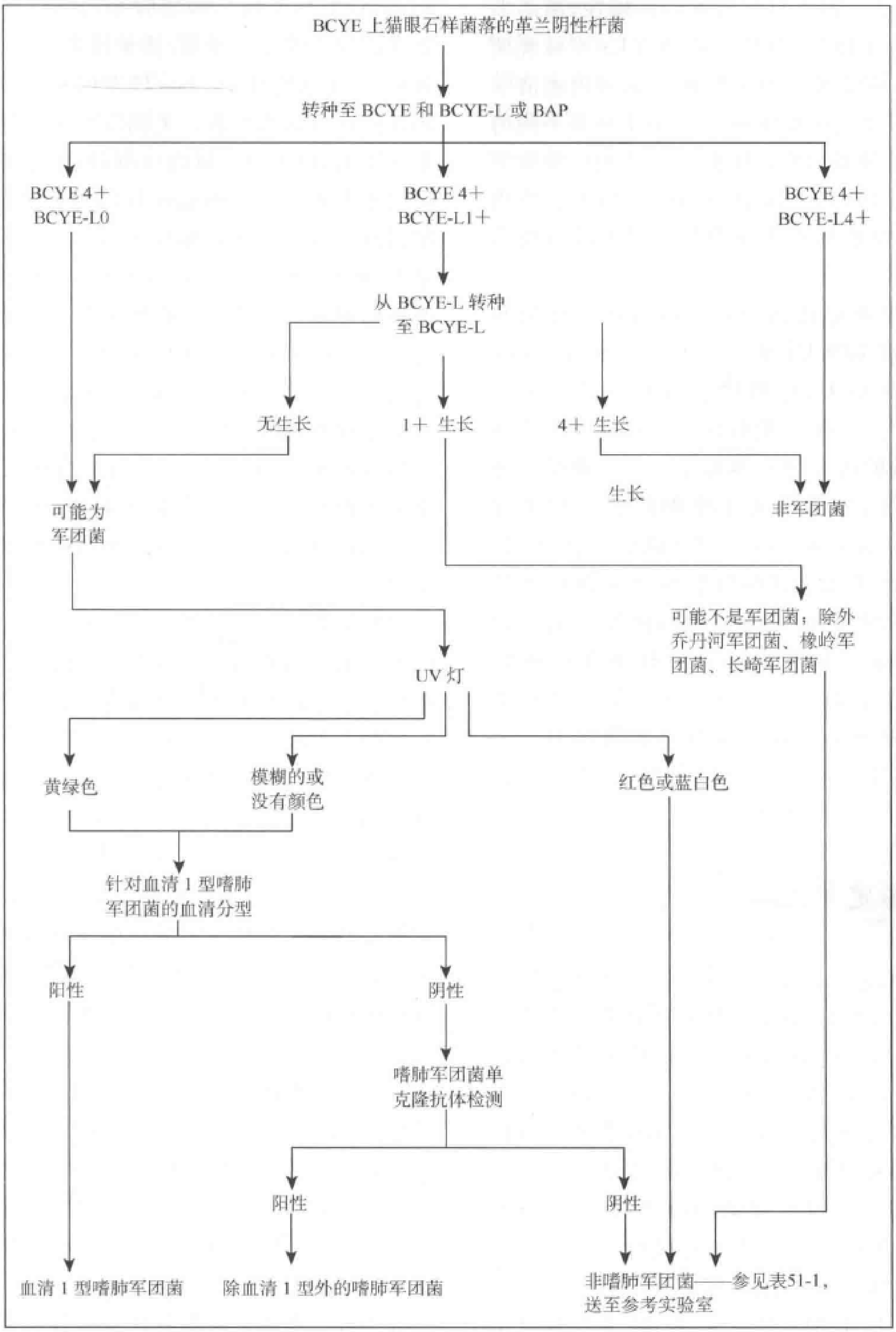


图 51-3　BCYEα 平皿上生长的军团菌初步鉴定的流程图。缩略词：BCYE，BCYEα；BCYE-L，不含 L-半胱氨酸的 BCYEα 培养基；BAP，大豆胰蛋白酶血琼脂培养基；UV 灯，长波长（360 nm）的紫外灯照射时，菌落会发荧光或呈现颜色

和军团菌相似[59]。随着孵育延长，侵蚀艾肯菌、黄杆菌属和鞘氨醇单胞菌属的菌落颜色发生改变，不再像军团菌；侵蚀艾肯菌菌落变为浅绿到深绿色，黄杆菌属菌落变为明亮的黄色，鞘氨醇单胞菌变为浅灰黄色。非常早期的铜绿假单胞菌和芽胞杆菌菌落像早期军团菌菌落（有斑点，扁平到轻微凸起），但延长孵育，它们的形态发生改变，很容易认定为非军团菌菌落。虽然百日咳鲍特菌（*Bor-*

detella pertussis）既不具半胱氨酸依赖性，菌落形态也与军团菌不相似，但是它在 BCYEα 平皿晚期会长出菌落。曾有报道百日咳鲍特菌曾因血清学的交叉反应误鉴定为军团菌[60]。由于许多不同的细菌与军团菌分型和鉴定用血清学试剂可能发生交叉反应，所以熟知本属细菌的形态和生长特点至关重要；仅仅依赖血清分型鉴别军团菌可能会导致错误结果。

微生物学家应该认识到一些致病性真菌和高等细菌可在 BCYEα 培养基上生长良好，这既存在潜在生物危害，也提供了诊断其他非可疑感染的机会。球孢子菌（*Coccidioides* spp.）通常 1～2 天内即可在该培养基上生长，并能迅速形成关节孢子；如此带来了生物危害。皮炎芽生菌（*Blastomyces dermatitidis*）也生长良好，且数日内转至霉菌相。其他致病性真菌在这种营养丰富的培养基上很可能长得同样好。诺卡菌（*Nocardia* spp.）和快生长分枝杆菌在这种培养基上经常生长得很好，这使 BCYEα 及其衍生的选择培养基成为实验室诊断诺卡菌病的一个选择[61]。有时诺卡菌菌血症可以通过转种血培养瓶到 BCYEα 上进行诊断。

八、菌落鉴定

1. 基本鉴定 在临床实验室，一旦确定 L-半胱氨酸依赖性，最好通过对该菌的血清分型进一步鉴定军团菌，血清分型可采用免疫荧光法（immunofluorescence）或凝集法[62-63]。另一种鉴定方法是基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）和基于 DNA 测序的方法。血清分型可鉴定出特定嗜肺军团菌的血清群，有时可鉴定菌种，取决于特定抗血清的有效性。这些方法在公共卫生实验室中可能发挥最大作用。

MALDI-TOF MS 可快速、经济、有效地对军团菌属（*Legionella*）进行种的鉴定，前提是仪器系统中有最新的、准确的军团菌特异性数据库。目前美国 FDA 认证的两种仪器系统的体外诊断数据库中，要么没有军团菌属（Bruker Daltronics，Billerica，MA），要么只有嗜肺军团菌（*Legionella pneumophila*）（bioMerieux Vitek，Durham，NC）。两种仪器系统的科研专用数据库可能不完全准确，需要使用补充数据库。目前美国 Vitek MS Saramis 数据库将一些嗜肺军团菌以外的军团菌错误识别为嗜肺军团菌，甚至错判为其他属（个人观察）。美国临床 Bruker 仪器的科研专用数据库的性能评价尚未发表。美国以外的数据库包括更多军团菌，但不包含属内所有种，鉴定不常见的种可能不准确[64-65]。Bruker 仪器的自定义数据库在军团菌种水平上正确鉴定率为 90%，军团菌属水平为 99%[66]。MALDI-TOF MS 目前无法进行血清群的鉴定。缺乏完整数据库和只能鉴定已知种是 MALDI-TOF MS 的明显缺点。参考实验室通过这种方法检测的分离株中，有 80%～90% 被正确鉴定到种，低敏感性部分由数据库不完整造成。一旦数据库更加完善，MALDI-TOF MS 应该能鉴定库内几乎所有已知军团菌种。如果 MALDI-TOF MS 不能鉴定分离株，必须选择其他方法鉴定细菌。

如果实验室已经采用 NAAT 方法检测临床标本中的军团菌或嗜肺军团菌，相同的方法在调整和评估成功后可用于培养分离株。这至少可以从属的水平给出正确的鉴定。

进行细菌分离株鉴定之前，应将培养皿在暗室中用长波 UV 灯照射；有些军团菌（不包括嗜肺军团菌）可产生耀眼的青白色荧光，有些呈现亮红荧光；这些细菌不是嗜肺军团菌，它们最好由参考实验室鉴定。嗜肺军团菌产生非常苍白的黄绿色荧光，其色素通常会扩散到培养基中，而这一特性对此菌种没有特异性，且有时早期培养物完全无荧光。

进行基本的血清学鉴定，有一种优秀的和特异的已获 FDA 批准的单克隆抗体（Monofluo；Bio-Rad），该抗体用异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）标记，可检测所有嗜肺军团菌的血清型。另一很好的、FITC 标记嗜肺军团菌费城 1 号菌株（m-TECH，http://www.4m-tech.com/）血清 1 型特异性多克隆抗血清试剂盒尚未获 FDA 批准。血清分型（serotyping）也可采用未获 FDA 证书的乳胶凝集抗血清，此试剂有多个品牌可供选择（Oxoid，United Kingdom；Denka Seiken，Japan；bioMérieux，France）；有关这些试剂诊断效能的数据还很少。

因为超过 90% 的军团菌分离株为血清 1 型嗜肺军团菌，所以首先检测菌株与该血清型抗体的反应既节省试剂又节省时间；与该抗体反应阴性

的菌株再用种特异性的单克隆抗体进行检测。极罕见的是，一些嗜肺军团菌（*Legionella pneumophila*）血清1型菌株与费城1号菌株的抗体无反应，采用这种试剂可能漏诊一些1型菌株；也可使用其他血清1型抗体（m-TECH，Milton，GA）。只有正确操作，结果才有效。最常见的错误是"前带现象（prozone phenomenon）"导致的假阴性，以及因缓冲液和洗液污染、对照交叉污染所致的假阳性[62]。最好把与嗜肺军团菌抗体无反应的菌株交给参考实验室或公共卫生实验室鉴定，他们有其他分型血清或分子鉴定方法。

从临床标本中分离出的革兰阴性杆菌，符合军团菌形态，且生长依赖L-半胱氨酸，在缺乏分型血清反应性时可初步报告为军团菌。具备军团菌特征的革兰阴性杆菌，与嗜肺军团菌单克隆抗体或嗜肺军团菌血清1型多价抗体发生反应，可鉴定为嗜肺军团菌或血清1型嗜肺军团菌，待次日一旦确定L-半胱氨酸生长依赖性即可最后确认。如果分离株与嗜肺军团菌种特异性抗体无反应或者确定是非血清1型嗜肺军团菌，则应交给参考实验室进一步分型。所有临床分离株均应−70℃冻存于含10%甘油的大豆胰蛋白肉汤中，并转种到BCYEα斜面培养基上，以便于公共卫生部门分析。

已有文献报道由多个不同军团菌菌种、多个不同血清型嗜肺军团菌引起的感染[67]。这种情况有时对确定流行源头有重要意义。不同形态的菌落通常代表了同一菌株的变异体，但有时代表了不同的种或血清型。对多个军团菌菌落进行鉴定和分型是确定此类病例的唯一办法。

2. 进一步鉴定　对嗜肺军团菌及其血清1型以外的其他军团菌，要用血清学准确鉴定是很困难的，这是因为不同菌种和血清型之间有血清交叉反应、生化反应迟钝，且不同种表型相似造成的。对这些细菌鉴定到种或血清型水平通常没有重要的临床意义，但对公共卫生和科学研究意义重大。调查LD暴发和单个病例需要军团菌鉴定和亚型知识；如果需要进行这些鉴定，只要冻存了分离株，都可以交给公共卫生实验室或参考实验室完成。此外，也可以直接对原始标本进行PCR扩增和测序进行菌株分型[46]。参考实验室使用的鉴定技术还包括应用收集的抗血清进行血清分型和分子学方法。

军团菌血清分型（serotyping）使用的试剂是CDC、其他公共卫生机构和商业实验室（m-TECH、Denka Seiken、Oxoid和其他公司）生产的多克隆抗血清。采用免疫荧光或凝集反应（agglutination reaction）进行检测时，没有明确证据表明某一家的产品更加优秀[62]。一些厂家生产能与很多军团菌种和血清型反应的多价血清池（pool），以减少单价抗血清的使用频率。但是对多价抗血清的特异性还没有深入研究，当前已发现至少有一种产品实际上与很多非军团菌发生反应[62]。因此，使用单价分型血清检测，并且受检细菌要满足军团菌的最低表型标准对于判定军团菌非常重要。遗憾的是，即使采用单价抗血清，不同种之间和血清型之间也可能发生交叉反应[62]。除了属内的交叉反应，单价多克隆抗体与很多非军团菌也存在交叉反应，已经报告的包括铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、黄杆菌属（*Flavobacterium* spp.）、脆弱拟杆菌（*Bacteroides fragilis*）、黄褐二氧化碳噬纤维菌（*Capnocytophaga ochracea*）、百日咳鲍特菌（*Bordetella pertussis*）和支气管脓毒鲍特菌（*Bordetella bronchiseptica*），可能还有类鼻疽伯克霍尔德菌（*Burkholderia pseudomallei*）。嗜肺军团菌血清1型的抗体特异性非常高，但其他型的抗血清存在很多交叉反应，以至于血清学鉴定只是作为推测性结果。另外，军团菌新种的抗血清往往是得不到的。

单克隆分型抗体虽然与革兰阴性菌的交叉反应大为减少，但市面上只能获得鉴定嗜肺军团菌的抗体[62]。即使如此，鉴定中仍要非常谨慎，因为已有报道显示嗜肺军团菌特异性单克隆抗体也能与一些非军团菌发生交叉反应，包括金黄色葡萄球菌、酵母菌和芽胞杆菌属。

军团菌属的生化反应迟钝，应用传统的试管和商业化的生化检测条不能对其进行鉴定。大多数实验室都能检测几个军团菌的基本生化特征，包括氧化酶、触酶和β-内酰胺酶试验，但这对鉴定军团菌帮助不大。

DNA-DNA杂交分析是鉴定新型军团菌的"金标准"。该方法烦琐，费用高，而且工作量大，还需要特殊的专业知识和收集大量的参考DNA序列。正因为此，DNA-DNA杂交分析不用于已知种的鉴定。

在研究型和专业实验室，基于下面一些理由，

军团菌分子鉴定取代了其他的鉴定技术。这些理由包括：菌株血清分型的人力成本和时间、血清学交叉反应、获得针对新型菌株的抗体受限、缺少特异和简单的生化特征方法，以及不太昂贵的DNA测序和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry，MALDI-TOF MS)分析系统的普及。

基于DNA序列的鉴定方法是利用了不同军团菌种的特异性16S rRNA和*mip*基因序列的差异[3,68-70]。*mip*数据库和扩增所需的引物序列、*mip*基因序列比对软件及其他基因组软件工具及其操作说明可从网上获取(http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php)。在鉴定几种新的军团菌时已经使用过16S rRNA序列分析[71-74]。部分16S rRNA序列(500 bp)能够准确地将所有的军团菌鉴定到属的水平，将所有嗜肺军团菌和约90%的除嗜肺军团菌以外的其他军团菌鉴定到种的水平；但对多数不常见的军团菌不能正确地鉴定到种[9,75]。已有研究显示，*rpoB*基因的DNA序列在鉴定军团菌的不同种时，与16S rRNA序列或*mip*基因序列表现一样好，甚至更好[76]。基因间的16S～23S核糖体间隔区PCR分析已成功用于种的鉴定，且无需DNA测序[77]；缺乏参考数据库和很多军团菌种的菌株资料限制了该技术的使用。尚不清楚*mip*测序与整个16S rRNA测序比较孰优孰劣，但是鉴定不常见的军团菌时不能仅仅依赖于部分16S rRNA测序结果。经这些方法检测过的参考菌株，尤其是一些不常见种的菌株数有限，参考比对的数据不多，所以会出现错误分类的可能。

基于NAAT的方法可区分嗜肺军团菌血清1型和其他血清型[78]。NAAT也可用于区分嗜肺军团菌血清1型中的庞蒂亚克/MAb 1/MAb 3-1型与非庞蒂亚克型菌株[17,78]。

相同血清型的军团菌基因型可不一致，反之亦然[79]。嗜肺军团菌*dnaJ*基因测序似乎能够区分一些血清型，但并不能区分全部型别[68]；有相似基因型的不同血清型菌株已可通过其他方法检测出并不一致的基因型和血清型。这个方法进行常规应用之前，需要进行更为深入地验证。

九、分型系统

军团菌分型对公共卫生调查非常重要。在疾病流行期，分子分型有助于确立培养阳性的环境场所与临床分离株间的联系。不能仅依靠分型来判断疾病暴发的环境发源地，必须同时结合流行病学调查资料。否则，可能对疾病发源地做出错误判断[80-81]。这可能是由于环境和临床军团菌的克隆分布[82-83]和一些分型方法的特异性差所致[84]。

单克隆抗体分型在嗜肺军团菌血清1型亚型分型中起主导作用，与分子方法一起使用能够提高分型的特异性[85-87]。单克隆抗体分型本身的特异性不足以区分紧密相关的菌株，但在疾病流行时，该方法可快速筛选环境分离株，确定哪些菌株需要基因分型。

基于序列的分型似乎是嗜肺军团菌和嗜肺军团菌血清1型最特异和最精确的分子亚型分型系统[88]。标准化的脉冲场凝胶电泳方法结果具有可重复性[83]。

全基因组测序(whole-genome sequencing，WGS)已成为大型公共卫生实验室流行病学调查的首选分型方法[89-90]。该方法具有很高的分辨率，可用于环境来源的调查。从单核苷酸多态性分析到使用一组核心基因，运用WGS可使用许多不同的方法来确定菌株之间的相关性。虽然在某些情况下使用更多的核心基因是有利的，但在鉴别力和流行病学一致性之间的最佳平衡点，是使用大约50个核心基因[90-91]。WGS的高分辨率揭示了一些被认为是单一菌株的环境位点实际上定植了多个菌株，这可能会使环境来源的确定复杂化[81]。

十、抗体检测

检测到针对灭活军团菌细胞的抗体滴度增加可以诊断LD[30]。公认的“金标准”为免疫荧光抗体分析(immunofluorescent-antibody assay)。大部分患者同时产生IgG和IgM两种反应，而一些患者仅产生IgM，或仅产生IgG或仅产生IgA，所以有必要检测所有免疫球蛋白，而不仅仅是IgG。

另外，感染后 IgM 抗体可持续长达一年之久，这使 IgM 成为一个很差的急性感染指标。约 75%经培养证实的血清 1 型嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)医院内感染 LD 患者对该菌产生血清转换，然而 LD 流行期间此检测敏感性更高。血清转换发生在感染后数周或数月，只有感染后 2 周出现的血清转换仅占 50%；为了达到最佳检测敏感性，应冻存急性期血清，并在感染后 2 周、4 周、6 周、9 周和 12 周收集恢复期血清。应对血清进行平行检验以达到最高特异性。针对嗜肺军团菌血清 1 型的血清转换检测特异性最高，且使用多价抗原检测最不特异，两种情况的特异性分别为 99%和 90%～95%。因为血清学诊断为回顾性的，且特异性和敏感性有限，因此该法最好用于流行病学研究。

十一、抗菌药物敏感性

采用肉汤和琼脂培养检测嗜肺军团菌药敏结果与临床没有相关性。这是因为人感染时，细菌定位在细胞内，而并非所有抗菌药物都能进入细胞内并保持活性[92]。另外，培养嗜肺军团菌的肉汤和琼脂成分复杂，能使很多药物失去活性。除了科研中对胞内和实验性动物感染模型相关性研究外，还没有军团菌药敏检测操作的说明。不能因为某种药物体外对嗜肺军团菌有活性就简单推测该药物治疗 LD 有效，同样，也不能推测体外对该菌 MIC 值低的药物一定比 MIC 值高的药物具有更好的临床疗效。尚未证实对治疗 LD 的抗菌药物耐药而导致临床治疗失败。近期，报道了 1 例嗜肺军团菌临床分离株对环丙沙星低水平耐药；它是否影响临床结果，以及环丙沙星治疗过程中是否产生耐药均未明了[93]。喹诺酮类(quinolone)药物在体内的耐药性最近已得到证实，但其临床意义尚不明确[94]。因科研目的进行药敏试验时，最好采用含缓冲酵母提取物肉汤的微量稀释法[95]。在军团菌的临床检测中，Etest 法无特别的益处，该方法也许可用于非野生型种群的检测，但微量稀释法才是最佳选择(http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Legionella_guidance_document_20160909.pdf)。

对胞内嗜肺军团菌具有活性的药物包括大部分大环内酯类(macrolides)、四环素类(tetracyclines)、酮内酯类(ketolides)和喹诺酮类(quinolones)药物[26]。β-内酰胺类(β-lactams)或氨基糖苷类药物不具有令人满意的针对该菌的胞内活性。尚不清楚是否可以将抗菌药物对嗜肺军团菌的胞内活性外推到其他军团菌，从而治疗嗜肺军团菌以外的军团菌感染。一些其他军团菌种可能定植的亚细胞结构与嗜肺军团菌不同，这样，它们对抗菌药物的反应可能不同[96]。然而，大环内酯类和喹诺酮类药物治疗米克戴德军团菌(*Legionella micdadei*)、长滩军团菌(*Legionella longbeachae*)、博兹曼军团菌(*L. bozemanae*)和杜莫夫军团菌(*Legionella dumoffii*)引起的 LD 似乎有效[97]。

十二、结果的评估、解释和报告

必须使用多种实验室方法才能使 LD 的实验室诊断最优化。从痰、肺及其他呼吸道标本培养出军团菌是诊断该病最特异的方法(100%)；在未经治疗的重症病例中敏感性很高(为 80%～90%)，在轻症病例中敏感性差(约 20%)。有时，培养是唯一的阳性检测，尤其是当嗜肺军团菌以外的军团菌导致的感染。由于培养诊断的技术难、费用高和非重症中敏感性低，几种备选诊断方法已经开发出来。尿抗原分析在诊断社区获得性感染时较培养更敏感，尤其是疾病流行期。即便如此，在条件最佳的情况下，尿抗原检测的敏感性也只有 60%左右，其诊断医院内感染效果差，且几乎无一例外只检测嗜肺军团菌血清 1 型。抗体检测可作为其他实验室诊断方法的补充，但它是回顾性的，它需要血清转换以提高检测的特异性和敏感性。另外，仅采用多价抗原得到的抗体检测结果必须慎重评估。分子扩增检测方法的敏感性很高，但美国还没有经 FDA 批准上市的产品。自研方法(homebrew assays)在实际应用前还需要广泛的室内评估。所有非嗜肺军团菌血清 1 型 LD 实验室诊断方法的效果都还是未知的，但推测其诊断不会优于嗜肺军团菌血清 1 型疾病。

评估所有 LD 实验室诊断方法的主要障碍是缺少 LD 诊断“金标准”。培养诊断虽非常特异，但众所周知，它不完美且敏感性有限，尤其对于流行

性 LD。这些检测的诊断效能常与培养法进行比较，但这会高估检测的敏感性，而低估其特异性。

事实上，任何一种军团菌培养阳性，加上相应的临床表现，如肺炎，即可诊断 LD。相反，单次血清标本中军团菌或嗜肺军团菌抗体升高通常不是LD。仅嗜肺军团菌血清 1 型抗体滴度增加(通常没有商品化方法)足以特异性诊断，但即便如此，为达到理想的特异性应结合其他适宜的技术。一旦排除可导致假阳性的热敏感因子(heat-labile factors)的影响，检测到嗜肺军团菌血清 1 型尿抗原，其特异性堪比阳性培养。阳性检测结果必须立刻报告给患者的接诊医生、感染控制和公共卫生部门。

参考文献请扫二维码查阅

第6篇

厌 氧 菌

第52章 厌氧菌的鉴定方法*

ANDREJ WEINTRAUB

（戴媛媛 译；刘根焰、苏建荣 审校）

厌氧菌是多种临床综合征的常见病原菌，包括吸入性肺炎、脑脓肿和腹腔感染[1-2]。厌氧菌是人体各黏膜部位正常菌群中的优势菌，也是部分内源性感染的机会性致病菌。此外，一些梭菌还可导致外源性感染。已知厌氧菌可引起：①血流感染；②头颈部感染；③胸部感染；④腹腔感染；⑤肠道疾病；⑥妇产科感染；⑦皮肤和软组织感染；⑧人工关节感染。肠道中的厌氧菌也被证明与自闭症和抑郁症等神经系统疾病有关[3-5]。因此，服务能力全面的微生物学实验室应具备厌氧菌检测、鉴定及药物敏感性试验的完整规程。无论如何，所有微生物学实验室至少应该具备培养和初步鉴定常见厌氧菌，并将不常见菌株提交给参考实验室确认的能力。随着分子生物学技术的应用（见以下章节），越来越多的厌氧菌新种被发现。各种新技术，包括焦磷酸测序和二代测序在内的分子生物学技术的研究结果显示，厌氧菌参与更多类型的感染过程，超出以往仅基于培养方法对厌氧菌感染的认知。本章提供一种基于临床实验室资源和能力的鉴定厌氧细菌的一般方法。

标本选择、采集、转运及处理对厌氧菌的检测结果影响很大。由于哺乳动物的所有黏膜部位都有厌氧菌定植，因此，标本采集须严格避免定植菌污染。最近出版的指南文件涵盖了基于症状的标本采集和处理程序[6]。

根据感染部位的不同，须使用不同的标本采集方法以分离各综合征相关的厌氧菌。头部和颈部的标本可通过经皮穿刺抽吸液体或脓液的方法获取。对于牙周标本，使用针吸法；对于牙龈下牙菌斑，使用纸尖或刮片取材，并将其插入带有厌氧转运介质的试管中。对于肺部标本，应使用经皮的肺部针刺抽吸术；对于深部支气管分泌物，应使用经气管抽吸物或支气管镜检查期间获得的保护性毛刷标本。对于关节感染，应采用针吸法采集关节液标本，通常是非手术方式采集。对于腹腔内感染，手术中获得的抽吸物或组织标本是厌氧培养的首选标本。女性生殖道感染，盆腔炎引起的腹腔积液应使用后穹隆穿刺术采集，子宫内膜抽吸或保护性采集器收集（子宫内膜标本）。无论感染部位如何，所有组织活检样品均应术中采集。

因为厌氧菌对空气中的氧耐受性差，厌氧培养标本必须在隔绝空气的容器中转运。某些植绒拭子能够在转运过程中保持厌氧菌的活力（<24 h），但由于拭子易于污染、收集标本量少等缺点，仅在某些特殊情况下因无法获取其他类型标本时使用，如脑脓肿[7]。标准血培养操作规程应该要求至少接种一个厌氧菌瓶[8]。*Wadsworth Ktl Anaerobic Bacteriology Manual* 第1章[1]和临床实验室标准化协会（CLSI）文件 M56-A《临床标本厌氧菌检测原理和操作规程》[9]，都补充了应当进行厌氧菌培养的部位。厌氧菌标本转运装置有：用于牙科标本采集的小瓶，内含特殊培养基及用以破碎团块的玻璃珠（只有具备特定专业技能的实验室才进行牙周和其他口腔感染标本的采集）；含厌氧气体及吸氧凝胶以保持微生物活性的大试管（Anaerobe Systems，Morgan Hill，CA）；液体标本应该用厌氧转运系统，如需抗凝则需要添加枸橼酸盐或 EDTA 抗凝剂；大块组织标本厌氧培养可采用普通的无菌容器[10]。

某些厌氧菌感染，对原始标本进行革兰染色

*本章包含 Ellen Jo Baron 在本手册第11版第50章中呈现的部分内容

是诊断的关键环节,并且有助于临床及时进行相应处理。由厌氧菌引起的尿路感染可首先通过革兰染色检出[11]。当尿路感染迁延不愈,且常规需氧培养阴性时,应当考虑在5% CO_2 中延长培养时间或进行厌氧培养。尿分子生物学分析方法已检出大量以前未考虑的厌氧菌,这些方法将来可能成为标准检测方法[12]。对于严重的坏死性筋膜炎、肌坏死或梭菌气性坏疽的患者,当革兰染色显示罕见的多形核白细胞或厌氧菌形态(如货车车厢形、革兰阳性或染色不定的杆菌),则提示患者需紧急手术。当分泌物涂片乳杆菌减少,而革兰染色不定的球杆菌大量增多时提示细菌性阴道病(第19章),革兰染色是该病的最佳诊断方法,实际上并不推荐培养。最新的分子生物学方法研究结果显示,许多与细菌性阴道病相关的微生物都无法进行培养[13-14]。

本书第55章详细描述了艰难梭菌(*Clostridioides difficile*,以前称为艰难梭菌属)感染的鉴定和诊断。

对于大多数标本,初始厌氧培养程序一般包括厌氧血琼脂(含马血或羊血,添加氯化血红素及维生素K)、拟杆菌胆汁七叶苷琼脂、含溶解羊血的卡那霉素-万古霉素琼脂及厌氧肉汤。在完全无氧环境下配制的商品化培养基已证实可提高某些厌氧菌的检出率[15]。如果平板能长出细菌,则不需考虑肉汤。但在某些情况下,如检测引起关节感染的皮肤杆菌(*Cutibacterium* spp.)时,肉汤培养需要延长至14天。接种后,应尽快将培养基置于厌氧环境中,以前使用氮气充填法,如今小型的培养容器,如塑料密封袋、密封盒、密封小罐,以及自动气体充填装置,如Anoxomat (Mart Microbiology, Drachten, The Netherlands)和Whitley Jar Gassing System (Micro-biology International, Frederick, MD),可缩短标本暴露于氧气中的时间。使用厌氧手套箱对所有标本进行处理和培养是确保严格厌氧菌活性的最佳方法。培养48 h后方可打开厌氧罐和厌氧盒,避免某些慢生长的厌氧菌在对数生长期暴露于空气而过早死亡。不过,引起气性坏疽的产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)生长非常迅速,过夜培养后即可鉴定。如果临床症状或初次革兰染色提示为该细菌,则应将该菌的接种平板单独放在塑料厌氧袋内[GasPak EZ Anaerobe Pouch System (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD); AnaeroPack (Mitsubishi Gas Chemical America, Inc., New York, NY)],以便能早期检测这些平板[16]。

早期革兰染色可获得在培养基上生长的厌氧菌的初步信息。对某些实验室而言,革兰染色可能是分析厌氧菌的唯一方法。对革兰染色结果的准确解读和及时报告,比对其进行不恰当的培养要好,因后者会导致误导性结果。

初次检查菌落时应使用体视显微镜(stereomicroscope)或至少使用高倍放大镜。使用放大镜观察可以区分在较远距离不能区分的形态相似的菌落,并可分辨大菌落附近的细小菌落。对于培养方法,使用无菌木质牙签轻触菌落的顶端,然后将挑取的细菌接种于一块厌氧血平板、一块巧克力琼脂平板,再点在玻片上,这样就可以保证在平板和玻片上观察的是相同菌落。如果实验室没有基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS),则厌氧血琼脂板应按照四区划线方式接种,可在第一区贴1000 μg卡那霉素、5 μg万古霉素纸片和10 μg多黏菌素纸片。根据不同抗菌药物的敏感性(直径≥10 mm)有助于进一步鉴定[17-18]。巧克力琼脂平板在5% CO_2 中孵育可检验许多厌氧菌的耐氧能力。那些非严格厌氧的细菌可采用常规方法鉴定。某些微生物可根据菌落和革兰染色形态学及几个药敏试验快速鉴定;其他的则需要更为复杂的试验。对于没有MALDI-TOF MS和分子生物学鉴定能力的实验室,VITEK系统的多参数厌氧菌及棒状杆菌鉴定卡(ANC ID card; bioMérieux, Durham, NC)也是不错的选择,该卡可以鉴定常见厌氧菌属[19]。

一旦疑似病原体被培养出纯菌落,有几种方法可用于正确鉴定。建立于20世纪60年代的传统方法是联合分析几个不同的预还原的生化反应结果和细菌短链脂肪酸的气相色谱检测结果,可将厌氧菌鉴定到属或种水平[20]。这些方法耗时长,准确的鉴定结果有时要1周时间。近年来,已研发了几款商品化的鉴定试剂盒。API 20A (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France)板条在厌氧条件下培养24~48 h,能鉴定一些基于糖酵解代谢途径的厌氧菌种。RapID ANA Ⅱ (Remel, Lenexa, KS)、Rapid 32A (bioMérieux)和VITEK ANI鉴定卡(Biomerieux)通过检测厌氧菌的预成

酶，可在4～6 h内给出鉴定结果。已有大量研究评价了商业试剂盒，并报道了在鉴定革兰阳性无芽胞杆菌、革兰阳性厌氧球菌和一些梭菌中存在的问题[19,21-22]。在部分实验室，MALDI-TOF MS已经取代了传统方法和商业试剂盒(第5章)。

MALDI-TOF MS技术应用于临床微生物实验室的常规病原(细菌和真菌)鉴定，给感染性疾病的诊断带来革命性影响。MALDI-TOF MS鉴定厌氧菌既快速又便宜(在首次购买仪器后)[19,23-28]。商用MALDI-TOF MS仪器[Maldbiotyper (Bruker-Daltonics, Billerica, MA)、VITEK MS(bioMérieux)]正受到诊断实验室的青睐，一些文献报道了其在厌氧菌鉴定方面的优异性能[29-34]。

在临床重要细菌的鉴定方面，与常规方法相比，MALDI-TOF MS方法简便易行。此外，该方法所需耗材少，方法本身的高敏感性对厌氧菌鉴定十分有利。特别是在分析口腔标本时，这点尤为重要，因为卟啉单胞菌和革兰阳性厌氧球菌的菌落非常小。目前有两个商业MALDI-TOF MS系统用于细菌鉴定，Biotyper(Bruker)和VITEK MS(bioMérieux)，两者的数据库可能有所不同，但样品制备和分析步骤基本相同。在过去5～10年时间里[35-37]，已有多篇文献对这两个鉴定系统进行了比较。此外，MALDI-TOF MS可通过检测美罗培南和厄他培南的水解产物来鉴定碳青霉烯酶产生菌，也适用于厌氧菌[29,38-41]。

最近报道了一种用MALDI-TOF MS鉴别不同核糖体型艰难拟梭菌的分析方法[30]。该方法非常快速、简便，为检测艰难拟梭菌的暴发流行提供了一种经济、有效的筛选方法。MALDI-TOF MS还能分辨Ⅰ型和Ⅱ型脆弱拟杆菌，对痤疮皮肤杆菌(*Cutibacterium acnes*)的分型也同样适用[31-33]。

当上述方法不足以对厌氧菌准确鉴定到属或种水平时，对具有分子检测能力的临床实验室，可以选择其遗传标志物分子进行测序，对厌氧菌进行鉴定，如16S rRNA片段及其他有用的遗传元件的序列[34]。改良的焦磷酸测序也有望用于厌氧菌的鉴定[42]。本手册第5章和第7章还讨论了使用这些方法和其他方法的一般原则及用途。本书以下章节(第53～56章)有更新的厌氧菌分类信息，包括最新版的变化。

临床重要的厌氧菌应进行药敏试验。基于多个研究者的总结：临床重要的分离株包括分离于血液、脑脓肿、心脏瓣膜或血管支架组织、骨髓炎患者的骨活检组织、关节抽吸液及假体装置感染源的菌株等。其他需要进行药敏试验的厌氧菌，包括从无菌部位分离的可能病原菌和从初始治疗失败患者分离的菌株。最近发表的一篇综述，非常好地总结了关于厌氧菌药敏试验和检测方法[43]。

2008年的一项调查结果显示，只有21%的实验室[44-45]进行厌氧药敏试验。Etest法(bioMérieux)作为检测单一厌氧菌药物敏感性的方法已使用多年，但它与参考方法——肉汤稀释法的相关性仍不理想[46]。对另一种类似的梯度纸条法，M. I. C. Evaluator Device (Thermo Fisher Scientific, Lenexa, KS)也进行了评估，但结果也不确定。与琼脂稀释法相比，一致性较低，且脆弱拟杆菌群和梭菌属对甲硝唑(13%～14%)和青霉素(8%～9%)的药敏结果存在较大误差[47]。其他方法包括螺旋梯度终点系统[43]，在厌氧手套箱内进行的肉汤稀释法也可接受，但其结果可能很难解释，目前指南仅限于脆弱拟杆菌群的菌株[45]。CLSI标准方法(琼脂稀释法)在临床实验室未普遍应用。欧洲药物敏感试验委员会(EUCAST Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobe Bacteria)也在致力于完善厌氧菌药敏试验程序[48]。

总之，厌氧菌检测已经成为临床微生物实验室相对独立且特色鲜明的技术组成部分。实验室必须明确自己在厌氧菌方面能做到何种程度，建立自己的检测流程并加以执行，以获得可靠、及时且准确的结果。重要厌氧菌还可以用厌氧肉汤或厌氧转运瓶随时送到参考实验室进一步检测。

参考文献请扫二维码查阅

第53章 消化链球菌属、芬戈尔德菌属、厌氧球菌属、嗜胨菌属、韦荣球菌属及其他厌氧球菌*

ALIDA C. M. VELOO, CRYSTAL N. JOHNSON

(田瑞卿 译，刘根焰、苏建荣 审校)

一、分类

对多数细菌学家来说，非常熟悉的革兰阳性厌氧球菌(Gram-positive anaerobic cocci，GPAC)是消化球菌属(*Peptococcus*)和消化链球菌属(*Peptostreptococcus*)。部分种属因为既往命名的反复改变和很多名称的相似性，常导致分类上的混淆。消化球菌属与其他GPAC关系较远，也很少从临床标本中培养到，该属唯一代表性的菌种是黑色消化球菌(*Peptococcus niger*)。至今，临床分离菌中最常见的GPAC仍然是消化链球菌属。然而，近几十年来，随着分子鉴定技术的应用，厌氧球菌的分类发生了巨大改变，同时还发现了一些新的种属。自1998年起，消化链球菌属被划分为6个新菌属[1-3]。该属目前包括4个种，只有厌氧消化链球菌(*Peptostreptococcus anaerobius*)和口腔消化链球菌(*P. stomatis*)[4]2个种可从人类标本中分离。其余2个菌种中，只有犬消化链球菌(*P. canis*)已从犬口腔龈下菌斑中分离出[5]。大消化链球菌(*P. magnus*)和微小消化链球菌(*P. micros*)被分别划入新增加的芬戈尔德菌属(*Finegoldia*)和小单胞菌属(*Parvimonas*)[3,6]。剩下的3个消化链球菌也分别建议划入厌氧球菌属(*Anaerococcus*)、嗜胨菌属(*Peptoniphilus*)和叶瘿菌属(*Gallicola*)[1]。厌氧球菌属有10个已确认菌种：产氢厌氧球菌(*A. hydrogenalis*)、解乳糖厌氧球菌(*A. lactolyticus*)、默多克厌氧球菌(*A. murdochii*)、第八厌氧球菌(*A. octavius*)、普雷沃厌氧球菌(*A. prevotii*)、四联厌氧球菌(*A. tetradius*)、阴道厌氧球菌(*A. vaginalis*)及新命名的塞内加尔厌氧球菌(*A. senegalensis*)[7]、*A. degeneri*[8]和*A. nagyae*[9]；除了这些已知菌种，还有6个待确认菌种：*A. obesiensis*[10]、*A. pacaensis*[11]、*A. provenciensis*[12]、*A. urinomassiliensis*[13]、*A. rubiinfantis*[14]和*A. mediterraneensis*[15]。嗜胨菌属有15个菌种：不解糖嗜胨菌(*P. asaccharolyticus*)、戈尔巴奇嗜胨菌(*P. gorbachii*)、黑尔嗜胨菌(*P. harei*)、产吲哚嗜胨菌(*P. indolicus*)、艾氏嗜胨菌(*P. ivorii*)、泪嗜胨菌(*P. lacrimalis*)、欧尔森嗜胨菌(*P. olsenii*)、噬甲硫氨酸嗜胨菌(*P. methioninivorax*)[16]、泰瑞尔嗜胨菌(*P. tyrrelliae*)[17]、考克斯嗜胨菌(*P. coxii*)[17]、杜尔登嗜胨菌(*P. duerdenii*)[18]、柯氏嗜胨菌(*P. koenoeneniae*)[18]、*P. stercorisuis*[19]、蒂莫内嗜胨菌(*P. timonensis*)[20]和*P. catoniae*[21]。与厌氧球菌类似，嗜胨菌属也有不确定的菌种：*P. obesi*[22]、*P. rhinitidis*[23]、*P. mikwangii*[24]、肥胖嗜胨菌(*P. grossensis*)[25]、*P. phoceensis*[26]、*P. vaginalis*[27]、*P. raoultii*[28]、*P. duodeni*[29]和*P. urinimassiliensis*[30]。值得注意的是，在公布了对泰瑞尔嗜胨菌(*P. tyrrelliae*)的描述之后，又发现了另一个与之相似的菌种——*P. senegalenis*[31]。本章只讨论泰瑞尔嗜胨菌(*P. tyrrelliae*)。叶瘿菌属仅包含一个巴氏叶瘿菌种(*Gallicolabarnesae*)，且至今尚未从人类标

*本章包含 Yuli Song 和 Sydney M. Finegold 在本手册第11版第51章中呈现的部分内容

本中分离到。最近又报道了 3 个新的革兰阳性厌氧球菌属：不解糖默多克菌属(*Murdochiella*)[32]、厌氧球体菌属(*Anaerosphaera*)[33]和 *Ezakiella*[34]，每个菌属只含有一个菌种。到目前为止，仅不解糖默多克菌属从人类临床标本中分离到。

来自临床标本的其他革兰阳性厌氧球菌的分类也在修订中，其中极小链球菌(*Streptococcus parvulus*)已被划分到陌生菌属(*Atopobium*)，并被命名为极小陌生菌；延长消化链球菌(*Peptostreptococcus productus*)被重新分类到新建的布劳特菌属(*Blautia*)，并被命名为延长布劳特菌(*Blautia producta*)[35]；解糖消化链球菌(*Peptostreptococcus saccharolyticus*)被并入葡萄球菌属。表 53-1 总结了 GPAC 种属分类的变化。

表 53-1 革兰阳性厌氧球菌的分类变化

现在的分类	以前的分类
黑色消化球菌	黑色消化球菌*
口腔消化链球菌	厌氧消化链球菌
厌氧消化链球菌	厌氧消化链球菌*
拉塞尔消化链球菌	新菌种
犬消化链球菌	新菌种
巴氏栖鸡球菌	巴氏消化链球菌(*Peptostreptococcus barnesae*)
微小小单孢菌	微小消化链球菌，微小微单胞菌
不解糖嗜胨菌	不解糖消化链球菌
考克斯嗜胨菌	新菌种
杜尔登嗜胨菌	新菌种
戈尔巴奇嗜胨菌	新菌种
产吲哚嗜胨菌	产吲哚消化链球菌(*Peptostreptococcus indolicus*)
黑尔嗜胨菌	黑尔消化链球菌(*Peptostreptococcus harei*)
艾氏嗜胨菌	艾氏消化链球菌(*Peptostreptococcus ivorii*)
柯氏嗜胨菌	新菌种
泪嗜胨菌	泪消化链球菌(*Peptostreptococcus lacrimalis*)
欧尔森嗜胨菌	新菌种
泰瑞尔嗜胨菌	新菌种
肥胖嗜胨菌	新菌种，无效
蒂莫内嗜胨菌	新菌种，无效
噬甲硫氨酸嗜胨菌	新菌种
Peptoniphilus obesi	新菌种
Peptoniphilus rhinitidis	新菌种
Peptoniphilus mikwangii	新菌种
Peptoniphilus catoniae	新菌种
Peptoniphilus stercorisuis	新菌种
阴道嗜胨菌(*Peptoniphilus vaginalis*)	新菌种，无效
Peptoniphilus raoultii	新菌种，无效
Peptoniphilus duodeni	新菌种，无效
Peptoniphilus phoceensis	新菌种，无效
Peptoniphilus urinimassiliensis	新菌种，无效
默多克厌氧球菌	新菌种
普雷沃厌氧球菌	普雷沃消化链球菌(*Peptostreptococcus prevotii*)
四联厌氧球菌	四联消化链球菌(*Peptostreptococcus tetradius*)

（续 表）

现在的分类	以前的分类
第八厌氧球菌	第八消化链球菌(*Peptostreptococcus octavius*)
产氢厌氧球菌	产氢消化链球菌(*Peptostreptococcus hydrogenalis*)
解乳糖厌氧球菌	解乳糖消化链球菌(*Peptostreptococcus lactolyticus*)
阴道厌氧球菌	阴道消化链球菌(*Peptostreptococcus vaginalis*)
塞内加尔厌氧球菌	新菌种
Anaerococcus obesiensis	新菌种,无效
Anaerococcus provenciensis	新菌种,无效
Anaerococcus pacaensis	新菌种,无效
Anaerococcus degeneri	新菌种
Anaerococcus nagyae	新菌种
Anaerococcus urinomassiliensis	新菌种,无效
Anaerococcus rubiinfantis	新菌种,无效
Anaerococcus mediterraneensis	新菌种,无效
大芬戈尔德菌	大消化链球菌
不解糖默多克菌	新菌属,新菌种
嗜氨基酸厌氧球体菌	新菌属,新菌种
Ezakiella peruensis	新菌属,新菌种
Slackia heliotrinireducens corrig.	*Peptostreptococcus heliotrinreducens*
极小陌生菌	极小链球菌
延长布劳特菌	延长消化链球菌,延长瘤胃球菌(*Ruminococcus productus*)
解糖葡萄球菌	解糖消化链球菌

*译者注:原文前后菌名没有变化

革兰阴性厌氧球菌(Gram-negative anaerobic cocci,GNAC)包括韦荣球菌属(*Veillonella*)、氨基酸球菌属(*Acidaminococcus*)、巨球菌属(*Megasphaera*)和厌氧球形菌属(*Anaeroglobus*),以及最近报道的阴性球菌属(*Negativicoccus*),形成了一个独立的菌科:氨基酸球菌科(Acidaminococcaceae)[36]。最近,韦荣球菌属中又加入了一些新的菌种,目前有13个菌种。从人类临床标本中分离到的菌种有:非典型韦荣球菌(*V. atypica*)、*V. montpellierensis*[37]、龋齿韦荣球菌(*V. denticariosi*)[38]、殊异韦荣球菌(*V. dispar*)、小韦荣球菌(*V. parvula*)、罗氏韦荣球菌(*V. rogosae*)[39]、当别町韦荣球菌(*V. tobetsuensis*)[40]和*V. seminalis*[41]。产碱韦荣球菌是小韦荣球菌的同义词。起源于动物的菌种有仓鼠韦荣球菌(*V. criceti*)、大鼠韦荣球菌(*V. ratti*)、啮齿韦荣球菌(*V. rodentium*)[42,43]、豚鼠韦荣球菌(*V. caviae*)[42]和大韦荣球菌(*V. magna*)[44]。除韦荣球菌属外,发酵氨基酸球菌(*Acidaminococcus fermentans*)和氨基酸球菌属中的肠氨基酸球菌(*A. intestine*)、巨球菌属(*Megasphaera*)中的埃氏巨球菌(*M. elsdenii*)、小核形巨球菌(*M. micronuciformis*)和厌氧球形菌属(*Anaeroglobus*)中的孪生厌氧球形菌(*A. geminatus*)也已从人类临床标本中分离到。

二、概述

本章主要介绍无芽胞专性厌氧球菌,包括部分细长型球菌。其中厌氧球菌属、厌氧球体菌属、芬戈尔德菌属、叶瘿菌属、默多克菌属、小单胞菌属、消化球菌属、嗜胨菌属和消化链球菌属均是革兰阳性球杆菌,偶尔也呈球形。纯培养物的革兰染色显微镜检,可见细胞大小为0.3～2.0 μm不等,成对、短链、四联、成簇或不规则排列,但大部分菌种呈链状或团簇状排列。不同种属之间,细菌糖代谢水平差别很大,大部分细菌不分解糖类,只有很小一部分细菌有很强的糖酵解能力。对于大多数厌氧球菌,主要能量来源是蛋白质水解产

物。葡萄球菌属中有两个菌种以前也属于厌氧菌:解糖葡萄球菌和金黄色葡萄球菌厌氧亚种(*Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius*),它们初代分离培养时需要厌氧环境,次代培养即变为可耐氧生长。有报道,临床标本中偶尔也能分离到专性厌氧生长的表皮葡萄球菌[45]。韦荣球菌属、氨基酸球菌属、巨球菌属、厌氧球形菌属和阴性球菌属均为革兰阴性球菌,大小为 0.3～2.5 μm 不等,主要成对排列,偶见单个、成簇或链状排列,微弱发酵或不发酵糖类,产生气体,其代谢产物的差异是革兰阴性厌氧球菌种属间鉴定的主要依据。

三、流行病学

革兰阳性厌氧球菌广泛分布于人类口腔、上呼吸道、胃肠道、女性泌尿生殖系统和皮肤,属于正常菌群的一部分[46]。其中,口腔菌群中革兰阳性厌氧球菌绝大多数是微小小单胞菌;皮肤菌群中最常见的是大芬戈尔德菌,其次是不解糖嗜胨菌。据报道,不解糖嗜胨菌经常分离自人类临床标本,然而研究表明,以往临床鉴定为不解糖嗜胨菌的菌株多为黑尔嗜胨菌[47],其生化特性与不解糖嗜胨菌相同,仅通过不规则菌落和细胞形态可与不解糖嗜胨菌区分。因此,临床资料中不解糖嗜胨菌的发生率可能被严重高估。革兰阳性厌氧球菌是机会致病菌,约占临床分离厌氧菌的1/3[46-48]。临床多个部位均可分离到革兰阳性厌氧球菌,其中最常见的仍然是脓肿和皮肤软组织、口腔、骨骼、关节、上呼吸道及女性生殖道等感染部位。深入研究发现,部分细菌与特定类型的感染密切相关,如大芬戈尔德菌主要与皮肤软组织感染有关,其次与骨和关节感染有关。纯培养分离的大芬戈尔德菌与骨科手术和术后伤口感染有很强的相关性[49]。厌氧消化链球菌和普雷沃厌氧球菌主要与腹腔和女性泌尿生殖道感染有关;微小小单胞菌是口腔感染的主要病原菌。

革兰阴性厌氧球菌分布于口腔、泌尿生殖道、呼吸道和消化道,构成人类正常菌群的一部分[46]。韦荣球菌属是人体口腔和泌尿生殖道正常菌群的一部分,在唾液和舌表面浓度最高[50-51]。韦荣球菌属还可以存在于上呼吸道和肠道中。有时也可以从感染部位分离出韦荣球菌属,多表现为混合感染。精液韦荣球菌(*V. seminalis*)主要分离自生殖道的临床标本(主要是精液),实际上只是混合培养物的一部分[41]。韦荣球菌属的其他种起源于啮齿动物的口腔微生物群,可以推测,这些物种可能引起这些啮齿动物咬伤后感染。食琥珀酸阴性球菌(*N. succinivorans*)已从人类皮肤或软组织标本中分离出来[36]。氨基酸球菌属和巨球菌属是肠道正常菌群的一部分,偶见于部分感染部位[52-53]。

四、临床意义

革兰阳性厌氧球菌是机会致病菌,能够引起全身各个部位的感染,感染类型从轻微的皮肤脓肿到较为严重乃至危及生命的感染,如脑脓肿、硬膜外脓肿、菌血症、心内膜炎、坏死性肺炎和感染性流产。在肺脓肿、坏死性肺炎、吸入性肺炎和脓胸等胸膜或肺部感染的病原菌中,厌氧球菌的比例达到 40%[54-55]。厌氧球菌还常见于皮肤、软组织感染及一系列急慢性创伤感染,如厌氧链球菌性肌坏死、进行性混合感染性坏疽、坏死性筋膜炎、伴捻发音的蜂窝织炎、慢性穿孔性溃疡和混合性坏死性蜂窝织炎等严重感染[46,56-57],临床病死率可高达 75%。厌氧球菌引起的其他重要感染还包括口腔和牙周感染、女性生殖道感染和腹腔内感染[58-60]。革兰阳性厌氧球菌还参与眼、耳、鼻、咽喉和头颈部感染(包括严重的颈部间隙感染),以及脑膜炎、心包炎、骨关节感染(包括人工关节)乳腺脓肿、尿路感染和有或无肛瘘的肛周直肠脓肿[61-62]。

由于厌氧球菌对营养要求苛刻,临床分离培养十分困难,因此很难准确评估其真正的临床意义。由于革兰阳性厌氧球菌感染多数是混合菌感染,加上其本身细菌分类不够明确,导致临床忽略了单一厌氧菌感染的临床意义。分子方法和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)的引入,使得 GPAC 的鉴定诊断能力明显提高,有利于更好地认识 GPAC 感染的临床意义。例如,最近 La Scola 等[63]通过 MALDI-TOF MS、PCR 和 16S rRNA 基因测序来鉴定血培养和骨关节标本中的 GPAC。此外,Rosenthal 等[64]也发现了一例由大芬戈尔德菌引起的菌血症。通过焦磷酸测序技术,多个研究已经证明创伤感染部位除需氧菌外,还大量定植了嗜胨菌、大芬戈尔德和厌

氧球菌等厌氧菌[65-69]。另一个有趣的研究表明，当用焦磷酸测序方法检测慢性鼻窦炎患者的微生物菌群时，发现以嗜胨菌属为代表的厌氧菌变成了优势菌群，而传统方法检测时葡萄球菌被认为是优势菌群[70]。

尽管多数情况下 GPAC 分离自混合感染标本，但有时也见于纯培养标本，如大芬戈尔德菌引起的感染，以及不常见的厌氧消化链球菌、不解糖嗜胨菌、产吲哚嗜胨菌、微小小单胞菌、阴道厌氧球菌、普雷沃厌氧球菌和黑尔嗜胨菌引起的感染[46,48,71]。

大芬戈尔德菌是最常见的致病性革兰阳性厌氧球菌，也是临床标本中最常分离到的 GPAC 之一。来自全身各部位的多种感染标本中均曾分离到大芬戈尔德菌纯培养菌株，如感染性心内膜炎、脑膜炎和肺炎，且部分已导致患者死亡[72]。大芬戈尔德菌常见于皮肤和软组织感染、骨关节感染及包括糖尿病皮肤溃疡和应激性溃疡在内的慢性创面感染，还可分离自化脓性关节炎、假体及植入物感染、乳腺脓肿、糖尿病足及鼻窦炎和中耳炎等上呼吸道感染标本。利用非培养技术，人们在培养阴性的心内膜炎和人工关节感染标本中检测到大芬戈尔德菌[73-74]，最近还报道了一例大芬戈尔德菌可引起中毒性休克综合征[64]。以上这些均表明大芬戈尔德菌的致病性及临床意义被低估了。随着更准确的检测及鉴定技术的应用，将改变大芬戈尔德菌在某些临床感染性疾病中的检出率，也将改变人们对该细菌的认识水平。Murphy 和 Frick 总结了与大芬戈尔德菌致病性相关的一些毒力因子，包括 L 蛋白、消化链球菌白蛋白结合蛋白（peptostreptococcal albumin-binding protein，PAB）、SufA 和大芬戈尔德菌黏附因子（*F. magna* adhesion factor，FAF）[48]。近年来，随着全基因组测序技术的运用，包括染色体编码的和质粒介导的毒力因子均已阐明，进一步加深了人们对大芬戈尔德菌致病性的理解[75]。其质粒上编码了 7 个转肽酶，染色体上发现了 4 个转肽酶，这些胞外转肽酶催化细胞壁蛋白的锚定，大量的转肽酶可能会影响大芬戈尔德菌的毒力。Donelli 等[76]最近研究发现，大芬戈尔德菌具有形成生物被膜的能力，可以逃避宿主免疫防御和抗菌药物治疗。

厌氧消化链球菌常见于混合感染，包括脑、耳、下颌、胸膜腔、骨盆、泌尿生殖道、腹壁、鼻中隔的脓肿及一系列急性和慢性的伤口感染[46-48]，也是腹腔和女性泌尿生殖道感染中最常见的革兰阳性厌氧球菌之一[46]。有报道，部分心内膜炎患者也曾分离出厌氧消化链球菌[77-78]。尽管厌氧消化链球菌以混合感染为主，但也有一些作为单一致病菌存在的病例报道[79-81]。厌氧消化链球菌与各种口腔感染相关，例如牙龈炎和牙周炎，也是根周脓肿的最常见致病菌。之前一直被错误鉴定为厌氧消化链球菌的口腔消化链球菌，与人类口腔感染相关，如牙槽脓肿和牙髓炎[4]。此外，在大量坏死的根管标本中，约 1/4 可以分离出该菌种[82]。新发现的消化链球菌的临床相关性至今仍不清楚。

微小小单胞菌是公认的口腔重要病原菌，但其本身也是口腔共生菌之一，只有数量明显增多时才会引起牙周疾病。其次，在牙髓病和扁桃体炎等其他口腔感染性疾病中也常分离到微小小单胞菌。近年来，分子生物学细菌鉴定技术进一步明确了微小小单胞菌与口腔感染密切相关[83]。当然，微小小单胞菌不只局限于口腔感染性疾病，身体其他部位的混合厌氧菌感染也常分离到微小小单胞菌，如一些皮肤感染、伤口感染、中耳炎、鼻窦感染、脓胸、腹腔感染、肛周脓肿、脓毒症、妇科感染、脊髓炎和人工关节感染等疾病。

随着分子生物学技术在临床样本检测中的应用，嗜胨菌属和厌氧球菌属的临床重要性也逐渐被证实。压疮标本中经常能检测到嗜胨菌属，如黑尔嗜胨菌、艾氏嗜胨菌和产吲哚嗜胨菌[66]。除了嗜胨菌属，GPAC 在这类标本中一般占主导。通过焦磷酸测序技术，研究人员发现在糖尿病溃疡[65,67]中，嗜胨菌属，大芬戈尔德菌和厌氧球菌属的检出率很高，在慢性鼻窦炎中嗜胨菌属的检出率很高[70]。普雷沃厌氧球菌则常见于阴道分泌物、卵巢、腹膜、骶及肺脓肿标本[84-85]。最近，有关创面生物被膜感染中细菌多样性的研究发现，解乳糖厌氧球菌和阴道厌氧球菌是糖尿病足和压疮的优势细菌[65]。通过 MALDI-TOF MS 和 16S rRNA 基因测序技术，阴道厌氧球菌和普雷沃厌氧球菌也在血培养阳性标本中被鉴定出来[63]。与新发现的消化链球菌一样，新的嗜胨菌属和厌氧球菌属的临床相关性至今仍未知。

临床标本中，革兰阴性厌氧球菌所占的比例

非常低，它们是口咽、胃肠道和女性生殖道共生菌群的一部分。部分感染标本偶尔能分离到韦荣球菌属，且多数作为混合感染的一部分存在[86]。韦荣球菌属感染的高危因素包括牙周疾病、免疫缺陷、静脉吸毒及早产。单一韦荣球菌属所致的严重感染极为罕见，在脑膜炎、骨髓炎、人工关节感染、胸膜炎、菌血症和心内膜炎中偶有报道[87]，但具体作用机制尚不清楚，且相关毒力机制也知之甚少。

关于厌氧球菌导致的各种感染，Murdoch 曾于 1998 年[46]做了非常系统的总结，自那以后，厌氧球菌感染谱基本未变，但以厌氧球菌为病原的感染率明显增加[21-22]。

五、标本的采集、运输和储存

大部分来自临床标本的 GPAC 常具有一定的耐氧能力，当临床怀疑厌氧球菌感染时，标本的采集、转运和储存可按第 52 章所描述的方法进行。

六、直接检测

临床样本的直接检测可以快速提供微生物感染的线索。目前已用于 GPAC 直接检测的技术有各种显微镜染色镜检技术、免疫学检测技术和分子生物学技术。

厌氧球菌的显微镜下形态多种多样，厌氧消化链球菌和延长布劳特菌属于大球杆菌，通常呈链状排列，尤其在液体培养基中更为明显。其他厌氧球菌的直径多大于 0.6 μm，成对或簇状排列，类似于葡萄球菌，常见的有四联厌氧球菌，普雷沃厌氧球菌和大芬戈尔德菌等厌氧球菌。微小小单胞菌的直径小于 0.7μm，呈束状或短链状生长，细菌大小的不同是区分微小小单胞菌和大芬戈尔德菌的特征之一。

七、分离培养

常规使用的厌氧菌分离培养基可支持本章描述的厌氧菌的生长，如布氏琼脂、哥伦比亚琼脂，或以斯氏琼脂培养基为基础添加 5% 羊血、维生素 K_1(1 mg/L)、溶血素(5 mg/L)的强化血琼脂平板。厌氧菌的常规分离要严格遵守厌氧操作规则。所用培养基要新鲜，以满足大部分厌氧菌生长对高湿度的需求。部分实验室如不能自制厌氧培养基，可以考虑使用商品化经过预还原的厌氧无菌血琼脂(如美国的 Anaerobe Systems、法国的 bioMérieux、印度的 HiMedia)。这些培养基保质期可长达 6 个月，其分离培养结果堪比甚至优于新鲜配制的培养基。

GPAC 之间差异较大，单一培养基不能支持所有代表性菌种的生长，并合理分离所有 GPAC。Turng 等[88]发明了一种用于微小小单胞菌的选择鉴别培养基，内含多黏菌素和萘啶酸的琼脂(Difco，Detroit，MI)。微小小单胞菌利用还原型谷胱甘肽产生硫化氢，硫化氢继而与醋酸铅反应，在菌落下面产生黑色沉淀。培养基中添加的吐温 80(0.02%)可以促进部分 GPAC 的生长。

Gutierrez de Ferro 等[50]观察不同培养基分离唾液样本中韦荣球菌的效果，最终发明了一种含万古霉素及溶血素的选择性培养基，可激发韦荣球菌产生红色荧光，分离韦荣球菌的效果最佳。

八、鉴定

部分 GPAC 革兰染色时容易脱色，变成革兰阴性厌氧球菌而被误读为韦荣球菌，如不解糖嗜胨菌。利用抗生素纸片(万古霉素 5 μg，卡那霉素 1000 μg，多黏菌素 10 μg)可以区分 GPAC 和 GNAC。培养时间较久的 GPAC 的细菌形态非常不规则，可变成球杆状和杆状而难以鉴别。

厌氧消化链球菌是唯一在 5% 聚茴香脑磺酸钠纸片周围有大于 12 mm 抑菌圈的 GPAC。微小小单胞菌在聚茴香脑磺酸钠纸片周围虽然也有抑菌圈，但抑菌圈直径通常小于 12 mm。根据经验，艾氏嗜胨菌也会出现大于 12 mm 的抑菌圈。但由于细菌形态的差异，易于与微小小单胞菌和厌氧消化链球菌区分。艾氏嗜胨菌是大球菌，微小小单胞菌是小球菌，厌氧消化链球菌为椭圆形，呈链状。大多数厌氧消化链球菌在厌氧血琼脂上培养 24 h，可形成直径为 1 mm、灰色、中央白色突起且具有芳香味的菌落[90]。结合菌落形态、革兰染色镜检细菌大小及蛋白水解酶生化谱，很容易区分微小小单胞菌和大芬戈尔德菌。如为菌落周围有乳晕形成且体积较小(<0.6 μm)的厌氧球

菌,可初步鉴定为微小小单胞菌[90]。大芬戈尔德菌的大小比所有消化链球菌都大,只有阴道厌氧球菌和艾氏嗜胨菌形成较大的菌体。另外有报道[6],利用脯氨酸芳基酰胺酶、苯丙氨酸芳基酰胺酶和酪氨酸芳基酰胺酶等蛋白水解酶活性试验也可以鉴别微小小单胞菌和大芬戈尔德菌。

黑尔嗜胨菌的大小与形状多种多样(直径为0.5~1.5 μm,形状呈圆形、卵圆形或椭圆形),而不解糖嗜胨菌的大小和形态较为一致,在营养血琼脂上培养5天后形成直径1 mm左右、圆形、扁平状的半透明菌落。

普雷沃厌氧球菌和四联厌氧球菌也存在相同的现象,既往认为这两种菌是临床样本中常见的GPAC菌种。然而,基于核酸的研究发现两者具有明显差异。同样,在2003年基于16S rRNA基因测序的研究,Song等[91]指出,既往被错误鉴定为普雷沃厌氧球菌或四联厌氧球菌的细菌实际上很大一部分是阴道厌氧球菌,而严格意义上的普雷沃厌氧球菌和四联厌氧球菌在临床样本中只是偶尔能分离到。利用焦谷氨酸芳基酰胺酶的活性可区分普雷沃厌氧球菌和四联厌氧球菌。然而,由于目前临床准确鉴定的普雷沃厌氧球菌和四联厌氧球菌数量有限,两种菌之间的真实差异性还难以准确描述。普雷沃厌氧球菌和四联厌氧球菌与其他GPAC之间可以通过是否产α-葡糖苷酶和β-葡糖醛酸酶加以鉴别。其他糖酵解阳性的GPAC也可以通过生化酶谱加以鉴别,如阴道厌氧球菌和解乳糖厌氧球菌。

表53-2总结了GPAC各自不同的特征。缺乏主要用于鉴定GPAC的表型数据的菌种在该表中未提及。鉴定试验主要基于细菌表型检测,且主要根据临床分离菌的表型特征,因此易于在大部分临床实验室开展。根据现有的表型特征,绘制了有助于鉴定GPAC的流程图(图53-1至图53-3)。

目前,有几种用于临床厌氧菌鉴定的商品化系统可供选择,如Rapid ID 32A(bioMérieux, Marcy l'Étoile, France)和RapID ANA Ⅱ(Remel, Inc., Lenexa, KS)。研究者以16S rRNA基因测序为标准,系统评估了Rapid ID 32A系统在临床GPAC鉴定中的性能,研究结果显示,该系统能准确鉴定微小小单胞菌、厌氧消化链球菌、大芬戈尔德菌。不解糖嗜胨菌通常也能被鉴定出来,但它与黑尔嗜胨菌具有相同的表型特征[47]。因此,鉴定为不解糖嗜胨菌时,应报告为不解糖/黑尔嗜胨菌。

GNAC的代表性菌属包括韦荣球菌属、氨基酸球菌属和巨球菌属。由于缺乏传统的表型和生化鉴定试验,韦荣球菌属在种水平上的鉴定仍然不够准确和方便。表53-3包含GNAC各个属之间鉴别诊断的关键试验[36]。

(一)分子生物学方法

20世纪90年代初,分子生物学技术的引入,改变了细菌鉴定的模式。基于16S rRNA基因的方法已被用于鉴定临床上重要的GPAC。单重或多重PCR技术和基于16S rRNA基因的鉴定技术均已用于临床标本中重要GPAC的直接鉴定[71,83,92-95]。Lin等[96]开发了一个针对临床重要厌氧菌的寡核苷酸芯片,可同时检测包括普雷沃厌氧球菌、四联厌氧球菌、大芬戈尔德菌、不解糖嗜胨菌、厌氧消化链球菌和微小小单胞菌在内的厌氧菌。上述方法的一个缺点是,只能识别方法中包含的菌种,而不能鉴定新菌种。

对于韦荣球菌属,不同种之间16S rRNA基因序列差异较小[38,97],这使得基于16S rRNA基因的PCR方法不适合进行这些菌种的鉴定。Marchandin等[98]利用热休克蛋白基因(*dnaK*)来区分韦荣球菌属的不同菌种,热休克蛋白基因的种间变异程度高于16S rRNA基因。Beighton等[99]报道使用*rpoB*基因测序技术鉴定从舌面分离出的韦荣球菌株,进而还开发了用于口腔中常见韦荣球菌属的一个简单的两步法PCR鉴定技术[93]。最近,Aujoulat等[41]开发了一种针对韦荣球菌柠檬酸合酶(*gltA*)基因的PCR法。根据这三项研究,三个管家基因*rpoB*、*dnaK*和*gltA*有助于区分不同种的韦荣球菌。

(二)质谱技术

近年来,基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)已经开始用于微生物菌种鉴定,并成为微生物鉴定新的"金标准",可谓微生物鉴定领域的二次技术革命。Veloo等[100]研究了不同因素(培养时间、样品制备和氧暴露)对厌氧菌光谱质量的影响。应在同一天(在有氧环境中暴露小于24 h)进行点样,由有经验的人员操作。MALDI-TOFMS分析应在培养48h进行,对于

表 53-2　不同 GPAC 菌种的生化特征[a]

菌种	吲哚	脲酶	ALP	ADH	α-Gal	β-Gal	α-Glu	β-Gur	ArgA	ProA	LeuA	PyrA	TyrA	HisA	GGA	SerA	甘露糖	棉子糖
Anaerococcus degeneri	−	−	+	w⁻	−	−	−	−	+	−	+	−	−	+	−	−	+	−
默多克厌氧球菌	−	−	+	+	−	+	−	−	+	−	+	+	−	+	−	v	+	−
四联厌氧球菌	−	+	−	−	+	−	+	+	+	−	−	+	w	+	ND	ND	+	−
解乳糖厌氧球菌	−	+	−	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	v	+	−
第八厌氧球菌	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−	−	−	+	−
普雷沃厌氧球菌	−	v	−	−	+	−	+	+	+	−	−	+	w	+	−	w⁺	+	+
阴道厌氧球菌	v	−	w⁻	+	−	−	−	−	+	−	+	−	−	+	−	v	−	−
产氢厌氧球菌	+	v	w⁻	−	−	−	v	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
Anaerococcus pacaensis[b]	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−
塞内加尔厌氧球菌	+	+	+	+	−	−	−	−	+	−	+	w	−	+	−	−	+	−
Anaerococcus provenciensis[b]	−	−	+	+	−	+	−	+	+	−	+	+	−	+	−	−	+	−
Anaerococcus nagyae	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+	−
考克斯嗜胨菌	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
泰瑞尔嗜胨菌	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−	+	+	−	−	−	−
黑尔嗜胨菌	v	−	−	−	−	−	−	−	+	−	v	−	v	+	−	−	−	−
艾氏嗜胨菌	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
欧尔森嗜胨菌	v	−	+	−	−	−	−	−	+	−	+	−	+	+	−	+	−	−
戈尔巴奇嗜胨菌	v	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−	+	+	+	+	−	−
杜尔登嗜胨菌	+	−	−	w	−	−	−	−	+	−	+	+	−	−	−	−	−	−
柯氏嗜胨菌	+	−	−	+	−	−	−	−	+	w	+	−	−	w	−	+	−	−
蒂莫内嗜胨菌	+	−	−	−	+	−	−	−	+	−	w	−	+	+	−	+	−	−
肥胖嗜胨菌	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−	+	+	−	−	+	−
泪嗜胨菌	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	+	v	+	−	+	−	−
不解糖嗜胨菌	+⁻	−	−	−	−	−	−	−	+	−	v	−	v	w	−	−	−	−
产吲哚嗜胨菌	+	−	+	−	−	−	−	−	+	−	+	−	w	+	ND	ND	−	−

(续 表)

菌种	吲哚	脲酶	ALP	ADH	α-Gal	β-Gal	α-Glu	β-Gur	ArgA	ProA	LeuA	PyrA	TyrA	HisA	GGA	SerA	甘露糖	棉子糖
Peptoniphilus obesi	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−
Peptoniphilus rhinitidis	+	−	−	−	ND	ND	ND	ND	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Peptoniphilus stercorisuis	−	−	−	+	−	−	−	−	+	−	+	−	+	+	−	+	−	−
Peptoniphilus catoniae	−	−	−	−	−	−	ND	−	−	ND	+	−	−	−	−	−	−	−
微小小单胞菌	−	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	w^+	+	−	−
大芬戈尔德菌	−	−	v	v	−	−	−	−	+	−	+	+	w^-	w^-	−	w^+	−	−
厌氧消化链球菌	−	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	w	−
口腔消化链球菌	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
拉塞尔消化链球菌	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
犬消化链球菌	−	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−
不解糖默多克菌	+	−	−	+	−	−	−	−	+	+	+	−	w^+	+	−	+	−	−
巴氏栖鸡球菌	w	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	ND	ND	−	−
黑色消化球菌	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	ND	ND	−	−
Ezakiella peruensis	+	−	+	−	−	−	−	−	+	−	+	+	+	+	+	−	−	−

注：[a] 数据主要来自 Murdoch[6] 和 Song 等[33] 的著作。菌种的生化特征来源于描述菌种的原始出版物。ALP. 碱性磷酸酶；ADH. 精氨酸双水解酶；α-Gal. α-半乳糖苷酶；β-Gal. β-半乳糖苷酶；α-Glu. α-葡糖苷酶；β-Gur. β-葡糖醛酸苷酶；ArgA. 精氨酸芳基酰胺酶(AMD)；LeuA. 亮氨酸芳基酰胺酶；PyrA. 焦谷氨酰芳基酰胺酶；TyrA. 酪氨酸芳基酰胺酶；HisA. 组氨酸芳基酰胺酶；GGA. 谷氨酸芳基酰胺酶；SerA. 丝氨酸芳基酰胺酶；ND. 尚未确定；−. >90% 阴性；+. >90% 阳性；v. 可变；w^+. 弱阳性。[b] 无效菌种。对于大多数无效菌种，生物化学特征被省略或仅有部分描述：*A. obesiensis*、*A. urinomassiliensis*、*A. rubiinfantis*、*A. mediterraneensis*、*P. methionivorax*、*P. mikwangii*、*P. urinimassiliensis*、*P. phoceensis*、*P. dougheli*、*P. raoultii* 和 *P. vagillis*。也没有描述嗜氨基酸厌氧球体菌的生化特征

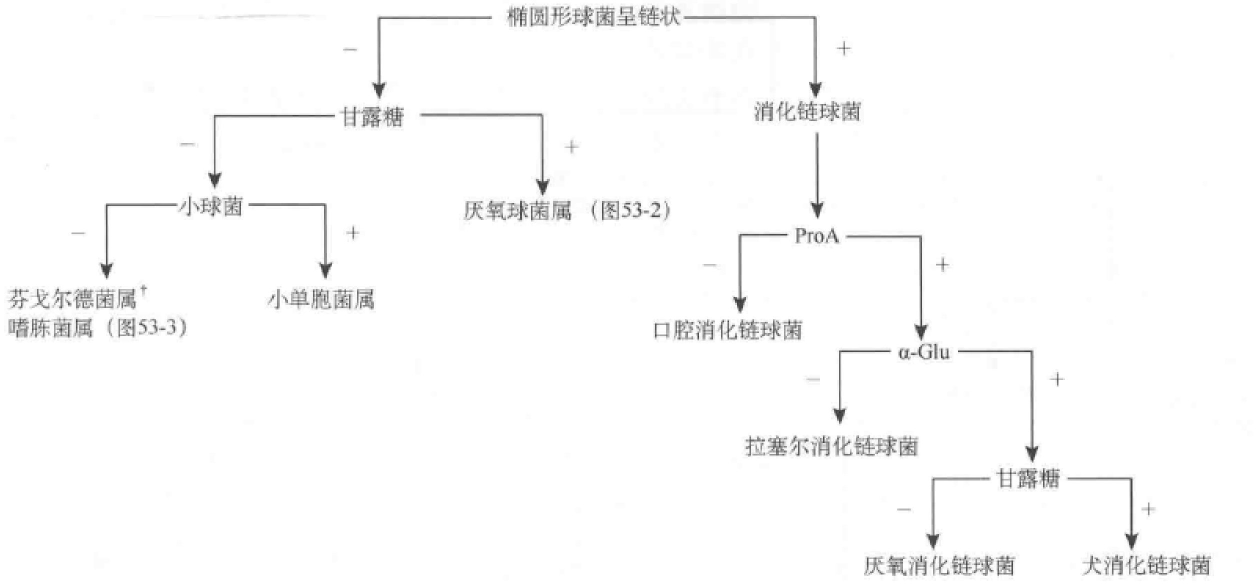


图 53-1　基于表型特征的 GPAC 鉴定流程图

注：†. 经生化试验确认（表 53-2）；ProA. 脯氨酸芳基酰胺酶；α-Glu. α-葡糖苷酶

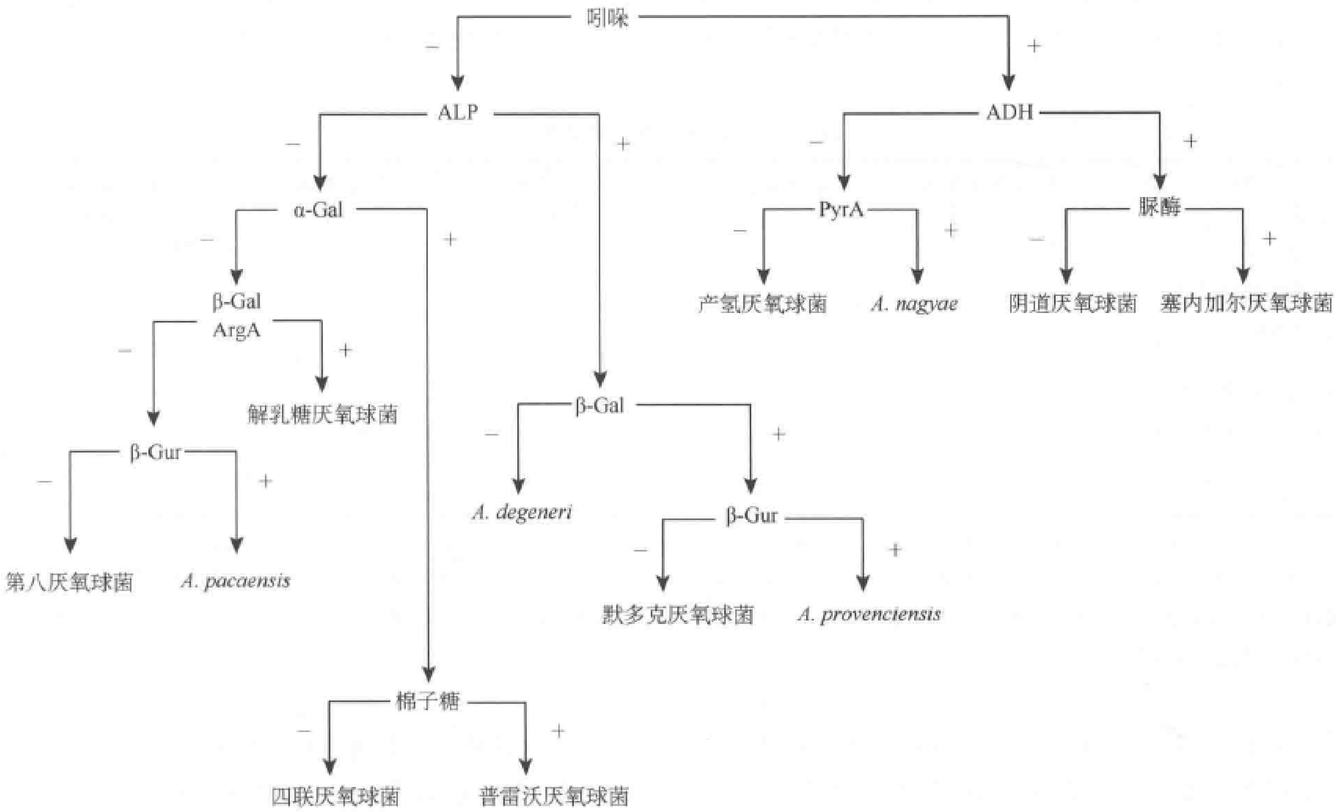


图 53-2　厌氧球菌鉴定流程图

注：ALP. 碱性磷酸酶；α-Gal. α-半乳糖苷酶；β-Gal. β-半乳糖苷酶；β-Gur. β-葡糖醛酸糖苷酶；ADH. 乙醇脱氢酶；PyrA. 焦谷氨酸芳基酰胺酶

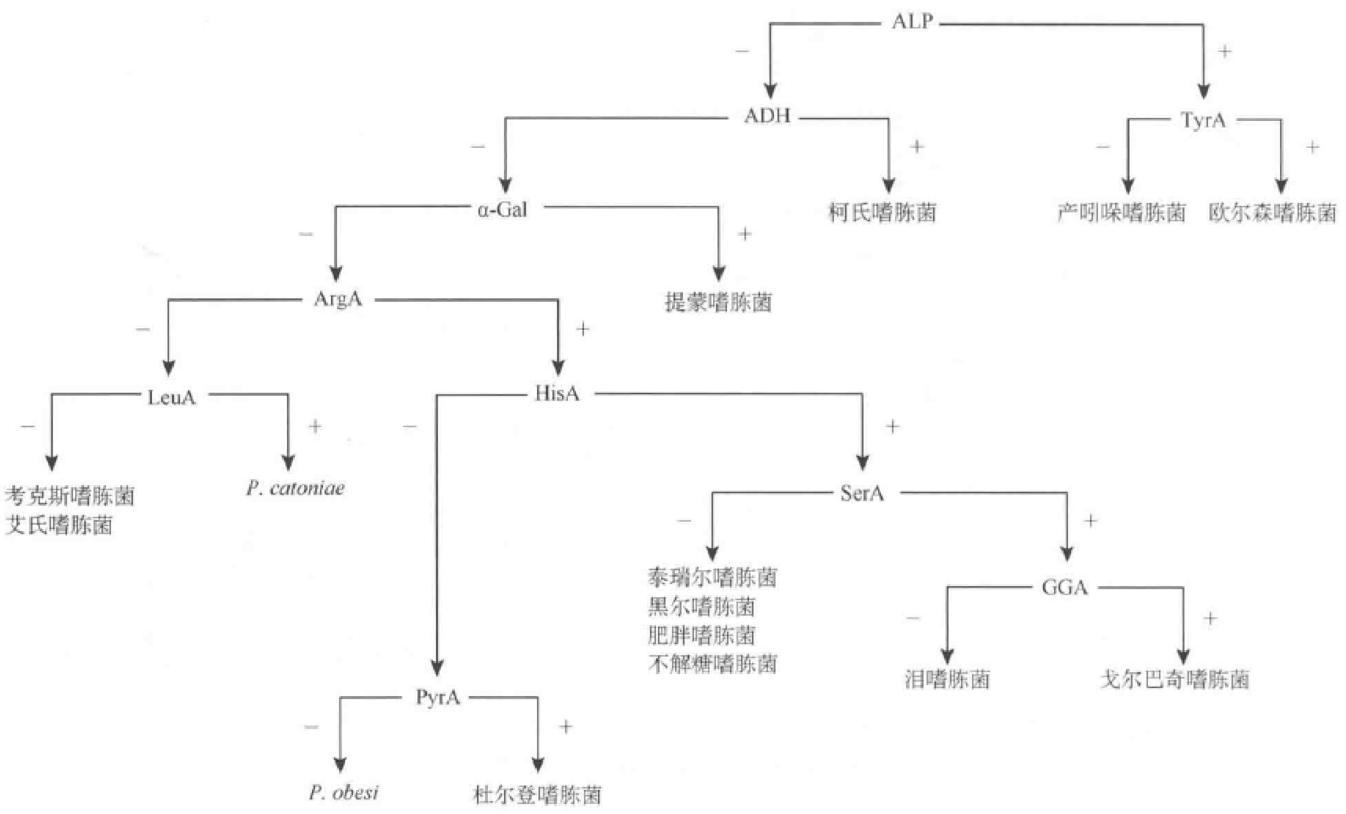


图 53-3 嗜胨菌鉴定流程图

注：ALP. 碱性磷酸酶；ADH. 乙醇脱氢酶；α-Gal. α-半乳糖苷酶；ArgA. 精氨酸芳基酰胺酶；HisA. 组氨酸芳基酰胺酶；PyrA. 焦谷氨酸芳基酰胺酶；SerA. 丝氨酸芳基酰胺酶；GGA. 谷氨酸芳基酰胺酶；TyrA. 酪氨酸芳基酰胺酶

表 53-3 革兰阴性球菌的特征[a]

特征	阴性厌氧球菌属	巨球菌属	韦荣球菌属	氨基酸球菌属	厌氧球菌属
细胞大小(μm)	0.4	1.7～2.6	0.3～0.5	0.5～1	0.5～1.1
微需氧环境中生长	+	−	−	−	−
硝酸盐还原试验	−	−	+	−	−
糖类发酵试验[b]	−	+	−	−	+
乳酸发酵试验	−	+	+	−	−
琥珀酸脱羧试验	+	−	+	−	−
氨基酸为主要能源[c]	−	−	−	+	−
产气	−	+	+	+	−
代谢终产物	A,P,(L)[d]	A,P,B,V,C	A,P	A,B,(P),(L)	A,P,iB,B,iV

注：[a] 本表根据 Marchandin 的论著修改[36]。[b] 葡萄糖发酵使用预还原的蛋白胨-酵母浸膏-葡萄糖(PYG)肉汤管(厌氧培养系统，Morgan Hill，加拿大)，接种无糖肉汤管培养的新鲜且生长旺盛的菌液，当培养结果 pH<5.5 时报告阳性，5.6～5.8 为弱阳性，>5.9 为阴性。[c] 属内多数种利用氨基酸而不利用糖类作为能量来源，A. 乙酸；P. 丙酸；L. 乳酸；B. 丁酸；V. 戊酸；C. 己酸；iB. 异丁酸；iV. 异戊酸。[d] 括号内产物表示不同种间产量不一致

革兰阳性厌氧菌，用 70% 的甲酸进行目标提取。Veloo 等以临床常见的 GPAC 分离菌株作为参考菌，构建 MALDI-TOF MS 数据库，实现临床分离株的快速鉴定，并且结果与其他鉴定方法具有可比性。相比分子生物学鉴定技术，两者鉴定准确性相当，但质谱技术更便宜、更快速。此外，MALDI-TOF MS 用于所有细菌鉴定均比传统方法更加经济。伴随 MALDI-TOF MS 系统出现的商业数据库，大多包含代表最常见的 GPAC 的参考光谱。Veloo 等[102]通过优化 Biotyper MALDI-TOF MS 数据库，使用数据库中代表性较好的临床分离菌种(已确认和待确认)、代表性不足或无代表性的菌种，使得可靠的菌种鉴定率从 53.6% 提高到 82.1%。用于 GPAC 鉴定的 Vitek MS 数据库的

研究尚未进行。使用 MALDI-TOF MS 可以鉴定不常见菌，使用表型方法可能会遗漏这些菌种，或鉴定不可靠。这样一来，便可以评估这些不常见菌的临床相关性。

MALDI-TOF MS 主要基于 16S 核糖体蛋白和管家蛋白[103]的测定，因而具有分类学意义。由于 16S rRNA 基因测序并不足以区分韦荣球菌属某些种，所以当 MALDI-TOF MS 用于鉴定韦荣球菌属某些种时，也可能会遇到这个问题。因此，还有待于进一步的研究。

九、抗菌药物敏感性

由于分类和鉴定技术的进步，关于各种 GPAC 药物敏感性的研究在不断增加，如最近的一项研究，收集了 115 株 GPAC，涵盖 14 个种，细菌鉴定采用分子遗传学技术，研究了 GPAC 对 14 种抗菌药物的敏感性[104]。然而，对于其他各种厌氧菌，有关药物敏感性方面的研究仍然很少。由于之前出版的研究数据并非种特异性，因此很难和新的研究数据进行比较。

青霉素、克林霉素和甲硝唑等抗生素通常是 GPAC 有效治疗的首选。然而，有研究发现，不同厌氧菌种之间的药物敏感性存在差异。因此，有关厌氧球菌耐药性的监测研究应该继续坚持，以应对潜在的耐药性的增长[105-109]。尽管 Wren 等报道微小小单胞菌和大芬戈尔德菌的临床分离菌中对青霉素的耐药性分别达 8% 和 16%，但是大多数研究表明不解糖嗜胨菌、大芬戈尔德菌和微小小单胞菌仍然对青霉素非常敏感[88]。其他关于大芬戈尔德菌耐药性的研究报道显示，该菌对克林霉素、甲硝唑和青霉素的耐药性较低（10%～20%），对红霉素、四环素的耐药性较高（>20%）[88,106-107,110-113]。但是，另外两个研究报道大芬戈尔德菌对克林霉素的耐药性较高[108,114]。Brazier 等[106]发现普雷沃厌氧球菌对四环素、红霉素、克林霉素等耐药。研究还发现，GPAC 整体耐药性最高的是对四环素，高达 41.6%，其次是红霉素（27.4%）、青霉素和克林霉素（7.1%）、阿莫西林/克拉维酸（3.5%）。有研究报道，糖尿病足标本中分离到的普雷沃厌氧球菌对克林霉素、左氧氟沙星和头孢他啶耐药[115-116]。据报道，6 株默多克厌氧球菌的临床分离株对多黏菌素耐药，2 株对卡那霉素耐药，1 株对克林霉素耐药，3 株对青霉素中介，同一研究还发现戈尔巴奇嗜胨菌对克林霉素耐药[117]。最近的一项研究表明，考克斯嗜胨菌对多西环素耐药，且有 29% 的菌株对莫西沙星和克林霉素耐药。但同时发现所有的泰瑞尔嗜胨菌对多西环素均敏感，对莫西沙星耐药，且其中有 25% 对克林霉素耐药[17]。对克林霉素耐药的不解糖嗜胨菌和微小小单胞菌也有报道[107,116,118]。研究表明，黑尔嗜胨菌的克林霉素耐药率从 0%[104] 增加到 21%[119]。由于以往黑尔嗜胨菌经常被误认为是不解糖嗜胨菌，因此有关该菌抗生素谱的数据很少。值得注意的是，最近 Shilnikova 等报道了一株多重耐药的大芬戈尔德菌[120]。

关于 GPAC 耐药基因的研究更少。2004 年，Theron 等[121]报道了 GPAC 中甲硝唑耐药基因（*nimB*）的存在。测试菌株（MIC≥0.5 mg/L）中，34% 携带 *nimB* 基因，其中有两株高度耐药的大芬戈尔德菌。在厌氧球菌（包括韦荣球菌属）中，有 16% 携带 *ermF*。未发现其他的耐药基因。

相比于青霉素、克林霉素、甲硝唑，GPAC 通常对 β-内酰胺类和 β-内酰胺酶抑制剂、头孢菌素类、碳青霉烯类和氯霉素等抗生素非常敏感[123]。头孢菌素多数情况有效，偶尔无效。碳青霉烯类抗 GPAC 活性非常强。研究表明，第一代喹诺酮类对 GPAC 只有轻微的抗菌活性，如环丙沙星[88,124,125]。其他新药的抗厌氧菌活性也可参考相关研究文献，如头孢吡普[115,126]、奥利万星[118]、达托霉素[127]、达巴凡星[26]、替加环素[128]和利奈唑胺[129]。厌氧消化链球菌对新研制的抗生素奥利万星极其敏感。

值得注意的是，口腔消化链球菌和厌氧消化链球菌的耐药率不同[108]。厌氧消化链球菌总体上对以下几种药物呈现耐药性：阿莫西林、阿莫西林/克拉维酸（3/30 菌株耐药）、头孢西丁（2/30 菌株耐药）、阿奇霉素和莫西沙星（1/30 菌株耐药）。31 株口腔消化链球菌的研究并未发现耐药。

韦荣球菌表现出对四环素、红霉素、庆大霉素和卡那霉素耐药，而对青霉素 G、头孢菌素和克林霉素敏感。韦荣球菌对氯霉素和林可霉素中度耐药[130]。然而，Ready 等[131]最近发表的一篇文章提到，从健康儿童的牙菌斑样本中分离出的韦荣球菌中，青霉素的耐药性为 64%，氨苄西林的耐药性为 39%。Marchand-Austin 等[132]也报道了其

对青霉素的高耐药率(55.5%)。Veloo等[119]的研究显示,从人类临床标本中分离的所有韦荣球菌均对阿莫西林、阿莫西林/克拉维酸、克林霉素和甲硝唑敏感。

十、结果的评价、解释和报告

临床厌氧菌检测耗时较长,比较满意的做法是分级报告临床检测结果。初级报告的内容应包括革兰染色结果、细菌和细胞的镜下形态。标本直接涂片染色,镜下观察不同细菌种类及相对数量有利于对标本质量进行全面评估、对混合感染菌群进行初步分析及对主要致病菌的初步判断。通常在结果分析时,优势生长菌、强毒力菌及耐药菌是关注的重点;其次是纯培养菌或大量生长菌基本可考虑是致病菌,如反复分离培养阳性或分离自正常无菌部位的细菌;此外,标本直接涂片结果还有利于指导培养基的选择以优化预期微生物的分离。

临床标本检测到革兰阳性厌氧球菌和革兰阴性厌氧球菌的意义与样本本身及样本是否被皮肤黏膜菌群污染密切相关。因此,厌氧菌培养的结果解释取决于送到实验室标本的性质及质量。

参考文献请扫二维码查阅

第54章　放线菌属、乳杆菌属、丙酸杆菌属和其他革兰阳性无芽胞厌氧杆菌*

SUSAN M. BUTLER-WU, ROSEMARY C. SHE

（田瑞卿　译；刘根焰、苏建荣　审校）

一、细菌分类与描述

革兰阳性无芽胞厌氧杆菌广泛分布于放线菌门(Actinobacteria)和硬壁菌门(Firmicutes)，这些菌门包含需氧菌和厌氧菌。然而，本章只重点介绍后者，尽管这些细菌部分也属于兼性厌氧菌。此外，这类细菌中的部分成员尽管拥有革兰阳性菌的细胞壁，但染色时呈革兰阴性。通过16S rRNA基因测序，对大量革兰阳性无芽胞厌氧杆菌进行了重新分类。利用新一代测序(NGS)方法对人类微生物组进行宏基因组分析，在这两个菌门中发现了新的菌属。值得注意的是，在这些分类上非常接近的菌群中，极少数菌种属于产芽胞菌，但仍保留在本章中。革兰阳性无芽胞厌氧杆菌分类学的亲缘关系如图54-1所示。随着宏基因组学的广泛应用，这群细菌的数量未来几年还将继续增加。

(一)放线菌门

1. 放线菌纲　革兰阳性无芽胞厌氧杆菌多属于放线菌门中的放线菌目和双歧杆菌科。放线菌属(*Actinomyces*)、放线棒菌属(*Actinobacu-lum*)、*Actinotignum*、动弯杆菌属(*Mobiluncus*)和小弯菌属(*Varibaculum*)都属于放线菌科。放线菌科包含厌氧菌和耐氧菌，革兰阳性且形态多样，包括特征性的分枝状杆菌和球杆菌。

截至本章撰稿时，从人类标本中分离出来的已确认的放线菌有25个种。随着宏基因组学数据鉴定出其他类放线菌样细菌，放线菌的种类还会增加。放线菌属的分类发生了很大的变化，例如，内氏放线菌(*Actinomyces naeslundii*)现在仅代表之前的“内氏放线菌1型(*A. naeslundii* genospecies 1)”。口腔放线菌(*Actinomyces oris*)和约翰逊放线菌(*Actinomyces johnsonii*)均代表新的菌种[1]。放线棒菌属以前的两个成员(斯氏放线棒菌和尿放线棒菌)已被重新划归于新的*Actinotignum*菌属，该属还包括一个新的种，即*Actinotignum sanguinis*[2-3]。放线棒菌属的其他成员还有马赛放线棒菌(原称*A. massiliae*)和猪放线棒菌(*Actinobaculum suis*)[4-5]。动弯杆菌属包括柯氏动弯杆菌(*Mobiluncuscurtisii*)和羞怯动

---

*本章包含Val Hall和Sarah D. Copsey在本手册第11版第52章中呈现的部分内容

译者注：

本章新的菌种较多，根据本手册第11版，结合本章内容，部分菌名翻译如下：

Cutibacterium 译为皮肤杆菌属

Actinobaculum suis 译为猪放线棒菌（MCM11 词表中：*Actinobacillus suis* 猪放线杆菌）

Coriobacteriia 译为红蝽杆菌纲

Class Bacilli 译为杆菌纲

Class Clostridia 译为梭菌纲

Actinotignum schaalii 译为斯氏放线棒菌

Class Erysipelotrichia 译为丹毒菌纲

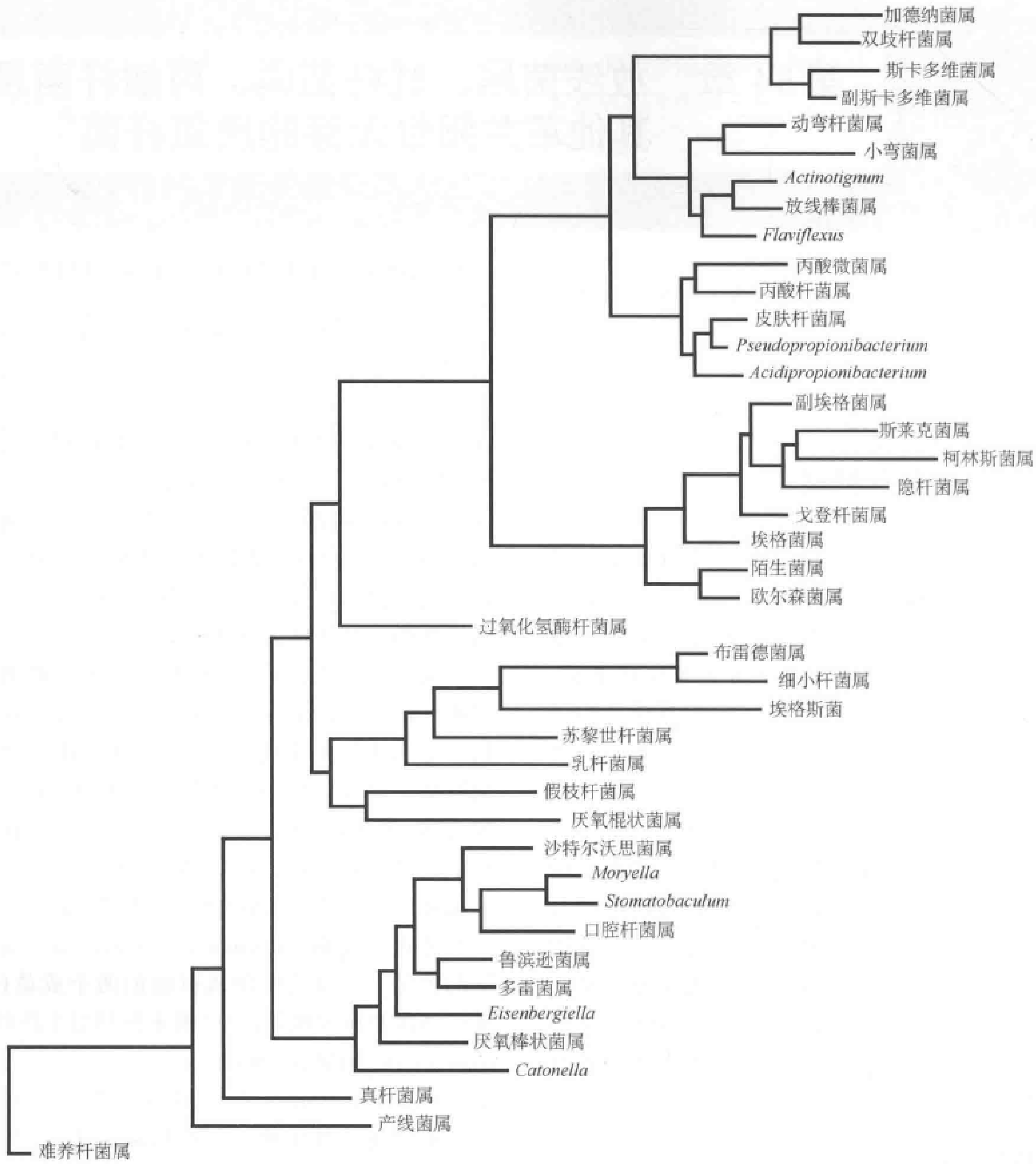


图 54-1 本章讨论的主要菌属的树状图[本图由 Fan Li 和 Jeffrey Bender(Children's Hospital of Los Angeles，Los Angeles，CA)创作并提供]

弯杆菌(*Mobiluncus mulieris*)两种，它们是严格意义上的厌氧弯曲杆菌，革兰染色形态多样。柯氏动弯杆菌通常是短而弯曲的杆状，而羞怯动弯杆菌通常为长而直或稍弯曲的杆状[6]。这两个菌种的某些菌株以前归为 *Falcivibrio*[7]，柯氏动弯杆菌和羞怯动弯杆菌，均为动力阳性。小弯菌属(*Varibaculum*)包括坎布里亚小弯菌(*Varibaculum cambriense*)[8] 和最近发现的 *Varibaculum anthropi*[9]，这两种细菌都是短的类白喉杆状，菌体直或弯曲状。

丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)为厌氧或耐氧的革兰阳性杆菌，多形性，分枝状，能分解葡萄糖产生丙酸。丙酸杆菌属细菌包含人类来源的和乳制品中分离的(所谓的"经典丙酸杆菌")。然而，最近发现皮肤来源的菌种在该属内形成一个独特的分支，导致了该菌属在分类学上变化显

著[10]。为此，痤疮丙酸杆菌（*Propionibacterium acnes*）、颗粒状丙酸杆菌（*Propionibacterium granulosum*）、贪婪丙酸杆菌（*Propionibacterium avidum*）和待确认的"*Propionibacterium humerusii*"[11]现在均被划归为新的皮肤杆菌属。引起放线菌病的丙酸丙酸杆菌（*Propionibacterium propionicum*）已被重新命名为 *Pseudopropionibacterium propionicum*[10]。已从人类分离出的其他与丙酸杆菌属密切相关的细菌，包括嗜淋巴丙酸微菌（*Propionimicrobium lymphophilum*）和无害产丙酸菌（*Propioniferax innocua*），这两种细菌之前都是丙酸杆菌属的成员[12-13]。嗜淋巴丙酸微菌可以呈棒杆状或球状，无害产丙酸菌为多形性杆状，呈簇状和V形排列。

双歧杆菌属及与其密切相关的异斯卡多维菌属（*Alloscardovia*）[14]、副斯卡多维菌属（*Parascardovia*）和斯卡多维菌属（*Scardovia*）[15]都属于双歧杆菌科。这些多形性的革兰阳性杆菌可呈形态一致、分枝状或棒状。同样，这些细菌有严格的厌氧菌，偶尔也有微需氧菌，后者如异斯卡多维菌属成员。目前有超过50种双歧杆菌，其中11种是从人类肠道和口腔中分离出来的。目前，长双歧杆菌（*Bifidobacterium longum*）包括以往的婴儿双歧杆菌（*B. infantis*）和猪双歧杆菌（*B. suis*）两个亚种[16-17]。

2. 红蝽杆菌纲（Class Coriobacteriia） 人类分离的陌生菌属（*Atopobium*）、欧尔森菌属（*Olsenella*）和柯林斯菌属（*Collinsella*）属于红蝽杆菌纲，红蝽杆菌目[18]。陌生菌属的许多菌种以前被错误地划分为厚壁菌门中的不同属（如乳杆菌属和真杆菌属）[19-20]。陌生菌属细菌为细长的革兰阳性小球杆菌，产生乳酸作为主要的代谢终产物。该属目前包括六个种（*Atopobium deltae*、化石陌生菌、微小陌生菌、极小陌生菌、龈裂陌生菌和阴道陌生菌）[19,21-22]。密切相关的欧尔森菌属包括四个种，其中两种是从人类口腔中分离出来的（树胶欧尔森菌和丰富欧尔森菌）[20,23]。柯林斯菌属有五个已知的菌种，为球杆状，呈链状排列[24]。

埃格菌属（*Eggerthella*）包括迟缓埃格菌（*E. lenta*）和中华埃格菌（*E. sinensis*）。香港埃格菌（*E. hongkongensis*）现在被归为新命名的副埃格菌属（*Paraeggerthella*），且是该属唯一的种[25]。这两个属都是革兰阳性杆菌，单个、成对或短链状。从人类分离出的埃格菌目的其他菌属还包括阿德勒菌属（*Adlercreutzia*）（球菌）[26]、隐杆菌属（*Cryptobacterium*）（短杆菌）[27]、*Enterorhabdus*（棒杆菌）、戈登杆菌属（*Gordonibacter*）（球杆菌）[28]和斯莱克菌属（*Slackia*）（革兰染色不定的棒杆菌）[29]。

(二)硬壁菌门

1. 杆菌纲（Class Bacilli） 乳杆菌属隶属于乳杆菌目的乳杆菌科。乳杆菌属是一个种类繁多、具有异质性的菌属，包括微需氧、触酶阴性、无芽胞的革兰阳性杆菌，发酵葡萄糖产生乳酸是该属唯一或主要的代谢终产物。已确定的菌种有220多个。随着分子鉴定方法的使用，许多菌种被重新归为其他菌属。不同菌种之间的亲缘关系复杂，目前正在进行进一步的研究，以更好地阐明迄今为止定义不清的乳酸杆菌的分类。

2. 梭菌纲（Class Clostridia） 真杆菌属（*Eubacterium*）既往被视为革兰阳性无芽胞厌氧杆菌的储菌库，其代谢不活跃，主要的酸性代谢产物也不包括丙酸、乳酸和琥珀酸。因此，无论是过去还是现在，这个菌属都具有令人难以置信的系统发育多样性，随着16S rRNA基因测序的出现，该菌属的分类发生了重大的变化。许多真杆菌属细菌被重新归为其他既有菌属或新的菌属。真杆菌属以前的成员现在广泛分布于硬壁菌门的许多目中。严格意义上的真杆菌属目前仅包括黏液真杆菌（*E. limosum*）、卡兰真杆菌（*E. callanderi*）和巴克真杆菌（*E. barkeri*）[30]。真杆菌科还包括另外两个属，且均已有人类分离株的报道。人粪厌氧棒形菌（*Anaerofustis stercorihominis*）和不解乳假枝杆菌（*Pseudoramibacter alactolyticus*）都是来自真杆菌属新命名的种，且是各自菌属唯一的种[30-31]。两者都是棒状杆菌，但后者成对或成簇排列。

真杆菌属的许多菌种与梭菌密切相关。重要的是，系统发育分析表明，把有没有芽胞作为梭菌属的分类标准可能是不准确的。例如，惰性真杆菌（*Eubacterium siraeum*）与柔嫩梭菌（*Clostridium leptum*）和人结肠厌氧棍状菌（*Anaerotruncus colihominis*）的关系最密切[32]。香港触酶杆菌（*Catabacter hongkongensis*）是一种不溶血、触酶

阳性、动力阳性、严格厌氧的革兰阳性球杆菌，是触酶杆菌科（*Catabacteriaceae*）的唯一成员[33]。

毛螺菌科的许多菌属以前被认为是真杆菌属。包括厌氧棒状菌属（*Anaerostipes*）、*Catonella*、多雷菌属（*Dorea*）及最近确认的 *Eisenbergiella*、毛绒厌氧杆菌（*Lachnoanaerobaculum*）、毛螺菌属（*Lachnospira*）、*Marvinbryantia*、*Moryella*、口腔杆菌属（*Oribacterium*）、鲁滨逊菌属（*Robinsoniella*）、罗斯伯里菌属（*Roseburia*）、沙特尔沃思菌属（*Shuttleworthia*）和 *Stomatobaculum*。厌氧棒状菌属以前被归类为粗大真杆菌（*Eubacterium hadrum*）[34]，*Dorea formicigenerans* 归为 *Eubacterium formicigenerans*[35]，沙状毛绒厌氧杆菌（*Lachnoanaerobaculum saburreum*）归为沙样真杆菌（*Eubacterium saburreum*）[36]。厌氧棒状菌属细菌为排列成短链的革兰阳性杆菌，而粗大厌氧棒状菌（*Anaerostipes hadrus*）因其菌体相对较大而得名，大小约 3 μm× 0.5 μm[34]。值得注意的是，*Anaerostipes rhamnosivorans* 和 *Anaerostipes butyraticus* 可以形成芽胞，而粗大厌氧棒状菌和粪厌氧棒状菌（*Anaerostipes caccae*）不能形成芽胞[34,37-38]。

Catonella morbi（最初被认为是拟杆菌属的一个种）是多形性、动力阴性、革兰阴性或革兰染色不定，成对或短链状排列的球杆菌。当这类细菌在含有可发酵碳水化合物的培养基中生长时，菌落中央会出现隆起[39]。多雷菌属（*Dorea*）于 2002 年从真杆菌属中划分出来自成一属，这类细菌是动力阴性、无芽胞的革兰阳性杆菌[35]。2014 年首次描述了 *Eisenbergiella tayi* 这一新菌种，根据 16S rRNA 基因序列分析，它与"*Clostridium-Clostridioides* 群"关系最为密切[40]。*E. tayi* 是一种动力阴性、无芽胞的杆菌，结构同革兰阳性杆菌，但常常染成革兰阴性[41]。菌体波浪形弯曲，中等大小，长或丝状，末端呈锥形[40]。*Lachnoanaerobaculum* 于 2012 年首次命名，具有多种特征。该属细菌是易脱色的革兰阳性无芽胞杆菌，菌体卷曲，丝状，菌落有隆起[36]。毛螺菌属包括两个种，即 *Lachnospira multipara* 和裂果胶毛螺菌（*L. pectinoschiza*）。*L. multipara* 是一种革兰染色弱阳性、无芽胞、单鞭毛、弯曲或螺形的杆菌，长可达 4 μm，末端尖钝[42]。裂果胶毛螺菌是具有周鞭毛的革兰阳性芽胞杆菌，延长培养时间可形成芽胞样结构[43]。

Marvinbryantia 是源自布兰特菌属（*Bryantella*）新命名的属[44]，*Marvinbryantia formatexigens* 是唯一的菌种。*M. formatexigens* 为革兰阳性无芽胞短杆菌，动力阴性，成对或短链状排列[45]。*Moryella indologenes* 是其属中唯一的菌种，是动力阴性、革兰染色不定的无芽胞杆菌，末端尖，通常单个、成对或短链状排列[46]。口腔杆菌属（瘘管口腔杆菌是其模式菌）是 2004 年命名的，2014 年增加了 *Oribacterium asaccharolyticum* 和 *O. parvum*[47-48]。这些细菌在结构上为革兰阳性，但可染成阴性，呈细长、卵圆形的无芽胞杆菌，单个、成对或短链状排列，并通过侧鞭毛运动[47]。鲁滨逊菌属（*Robinsoniella*）因其独特的 16S rRNA 基因序列，2009 年提出将其作为一个新的菌属，其中皮奥里亚鲁滨逊菌（*Robinsoniella peoriensis*）是唯一的菌种[49]。该菌是卵圆形至短杆状的革兰阳性菌，单个或成对排列。芽胞位于次极端，不超出菌体。

1983 年首次报道，*Roseburia cecicolav* 是罗斯伯里属中第一个命名的种[50]。后来在 2002 年增加了小肠罗斯伯里菌（*Roseburia intestinalis*）[51]，2006 年又陆续增加了 *Roseburia faecis*、*Roseburia hominis* 和 *Roseburia inulinivorans*[52]。罗斯伯里菌属细菌是稍弯曲的杆菌，其革兰染色不定或呈阴性，通过多个近端鞭毛运动[51-52]。以卫星沙特尔沃思菌（*Shuttleworthia satelles*）为模式菌的沙特尔沃思菌属（*Shuttleworthia*），是一种无芽胞、动力阴性、革兰阳性、短且呈多种弯曲状散在排列的杆菌，可成对、短链或类白喉状排列[53]。*Stomatobaculum* 是 2013 年提出的新菌种，根据 16S rRNA 基因位点，它是与 *M. indologenes* 亲缘关系最近的菌种[54]。*S. longum* 是一种动力阴性、无芽胞、革兰染色不定的杆菌，菌体可长达 40 μm，通常有隆起，单独或成链排列，还可以是弯曲的丝状形态，长达 200 μm。

Peptostreptococcaceae 科和 Ruminococcaceae 科尽管名称不同，但均包含有革兰阳性无芽胞厌氧杆菌，其中许多与梭状芽胞杆菌有近亲缘关系。龈沟产线菌（*Filifactor alocis*）和绒毛产线菌（*F. villosus*）与尤里真杆菌（*Eubacterium yurii*）相关，是 Peptostreptococcaceae 的成员[55-56]，该菌属有时会形成芽胞。厌氧棍状菌属是一种细杆状芽胞杆菌，属于 Ruminococcaceae 科[32]，人结肠厌氧棍状菌是该属唯一成员。该科所记录的分离自

人类的其他成员包括普拉栖粪杆菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)和 *Subdoligranulum variabile*[57-58],后者革兰染色呈阴性,形态多变,从球状到液滴状不等。

最后,革兰阳性无芽胞厌氧杆菌还有三个属隶属于梭菌纲(Clostridia),它们已从人体分离出来,但目前尚未归到这一菌纲的任何科。难养杆菌属(*Mogibacterium*)包括 5 种不解糖的(*asaccharolytic*)菌种,它们是短小的革兰阳性杆菌,与娇弱真杆菌(*Eubacterium infirmum*)密切相关[59-60]。普劳特真杆菌(*Eubacterium plautii*)与 *Clostridium orbiscindens* 一起被重新归为普劳特解黄酮菌(*Flavonifractor plautii*)[61]。普劳特真杆菌为直或略呈球状,虽然它不形成芽胞,但在该菌种中可以检测到形成芽胞的特异性基因 *spoA*。胃球菌属(*Ruminococcus*)和 *Coscocoides* 属中的许多菌种被重新归为布劳特菌属(*Blautia*)的 12 个已确认的菌种[62-64]。这些革兰阳性球杆菌呈椭圆形,末端尖锐。与该属中的某些梭菌一样,一些分离株可形成芽胞。

3. 丹毒纤毛菌纲(Class Erysipelotrichia) 许多革兰阳性无芽胞厌氧杆菌在系统发育上,和其他菌属相比,与猪红斑丹毒丝菌更密切相关。缓慢布雷德菌(*Bulleidia extructa*)为短杆菌,单个或成对并排排列[65]。三冈链形杆菌(*Catenibacterium mitsuokai*)[66]分离自巴布亚新几内亚高地人的粪便,是呈杂乱链状排列的革兰阳性杆菌。*Coprobacillus catenaformis* 为链状排列的球杆菌,在表型上类似于柯林斯菌属(*Collinsella*)[67]。链状埃格斯菌(*Eggerthia catenaformis*)(以前称为链状乳杆菌 *Latetobacillus cateniformis*)是短链状排列的杆菌[68]。线形霍尔德曼菌(*Holdemania filiformis*)和马赛霍尔德曼菌(*H. massiliensis*)成对或短链状排列[69-70]。莫氏细小杆菌(*Solobacterium moorei*)通常为单个存在的小杆菌[71]。最后,血苏黎世杆菌(*Turicibacter sanguinis*)是形状不规则的长杆菌,可形成长达 30 μm 的长链[72]。

二、流行与传播

大多数革兰阳性无芽胞厌氧杆菌是人体黏膜表面(如胃肠道和泌尿生殖道)及皮肤上的共生菌的成员[73-75]。尽管有些细菌与健康的微生物菌群有关,但微生态失调可能导致疾病状态,如细菌性阴道病(bacterial vaginosis,BV)。其中单个细菌在促进微生态失调和疾病状态中的作用才刚刚开始被了解。这类细菌引起的感染,宿主自身所处状态是主要原因。其他正常菌群引起的感染还可见于因咬伤(人或动物)或拳击所致面部或口腔的感染[76]。

三、临床意义

当革兰阳性无芽胞厌氧杆菌进入特定部位时,会引起感染。这些细菌很少单独引起感染,通常引起与黏膜表面有关的混合感染(表 54-1)。引起头颈部感染的许多厌氧菌起源于口腔,大多数阴道和膀胱感染的厌氧菌来源于粪便。对于器官穿孔引起的腹腔内感染,存在的细菌取决于渗漏部位的菌群[77]。对于外科手术患者,厌氧菌是引起感染和死亡的重要病原菌[78]。厌氧菌感染有时会向组织周围或经血流侵袭扩散,造成严重后果。对于厌氧菌菌血症,胃肠道是最常见的来源,其次是脓肿、妇科感染和伤口感染[79]。由于生长缓慢和营养要求苛刻,血培养中革兰阳性厌氧杆菌的检出率和种类可能被低估。与之相比,梭菌和脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)群成员在常用肉汤培养基中容易生长且生长快速[80]。

表 54-1　革兰阳性无芽胞厌氧菌属的基本特征

菌名	细菌形态	耐氧性[a]	革兰染色[b]	其他特性	临床相关性
放线菌纲					
放线棒菌属	直杆状或微弯曲,偶呈分枝状	+/−	+	分解糖	尿路感染
放线菌属	多形性,多有分枝(少数除外);单个或成对	+/−	+	分解糖	放线菌病
Actinotignum	杆状或微弯曲;偶呈分枝状	+/−	+	分解糖	尿路感染
阿德勒菌属	球杆菌	−	+	不分解糖	肠道菌群
异斯卡多维菌属	短杆,不规则形态	+	+	分解糖	尿路感染

（续 表）

菌名	细菌形态	耐氧性[a]	革兰染色[b]	其他特性	临床相关性
陌生菌属	短杆，椭圆形；单个，成对或短链	+/−	+	分解糖	阴道感染，BV(阴道陌生菌)
双歧杆菌属	多形性	+/−	+	嗜酸	菌血症，各种感染
柯林斯菌属	短杆，成链	−	+	分解糖，产 H_2	口腔和肠道菌群
隐杆菌属	短杆	−	+	不分解糖	口腔感染
丙酸杆菌属	多形性；分枝和不分枝	+/−	+	分解糖	假体材料感染（如关节、心脏瓣膜等）
埃格菌属	球杆或短杆状；成对或短链	−	+	不分解糖	菌血症，各种感染
Enterorhabdus	杆状	+	+	分解糖	肠道菌群
戈登菌属	球杆；动力阳性	−	+	不分解糖	肠道菌群；1 例菌血症报道
动弯杆菌属	弯曲且末端尖细，单个或成对，动力阳性	−	+	分解糖	阴道感染，BV(柯氏动弯杆菌)
欧尔森菌属	短杆，椭圆形；单个，成对或短链	−	+	分解糖	龋齿；其他感染(罕见)
副埃格菌属	球杆状；成链	−	+	不分解糖	菌血症
副斯卡多维菌属	短小，细长，多形性	−	+	分解糖	龋齿
无害产丙酸菌	多形性；成簇	+	+	分解糖	皮肤菌群
丙酸微菌属	多形性；常为类白喉杆状或棒状	−	+	分解糖	尿路感染
Pseudopropionibacterium	球杆或短杆状；成对或短链	+	+	分解糖	放线菌病
斯卡多维菌属	短小，球状，多形性	−	+	分解糖	龋齿
斯莱克菌属	球状，球杆状或短杆状；单个或成簇	−	(+)	不分解糖	口腔感染；脓肿
小弯菌属	短小，直或弯曲，类白喉杆状	+/−	+	分解糖	IUD 感染
硬壁菌门					
厌氧棒形菌属	细杆	−	+	分解糖	肠道菌群
厌氧棒状菌属	细杆；短链状	−	(+)	分解糖	肠道菌群；1 例菌血症报道
厌氧棍状菌属	细杆	−	+	分解糖	肠道菌群；1 例菌血症报道
布劳特菌属	球杆状；可为椭圆形或有尖端	−	+	分解糖	肠道菌群
布雷德菌属	短杆状或微弯；单个或成对	−	+	分解糖	牙周炎，脓肿
触酶杆菌属	球杆状或短杆状；运动	−	+	分解糖	菌血症
链形杆菌属	短杆；长链缠绕状	−	+	分解糖	肠道菌群
Coprobacillus	球状；成链	−	+	分解糖	肠道菌群
Catonella	球杆状；成对或短链	−	−	分解糖	口腔菌群；1 例心内膜炎报道
多雷菌属	短杆或长杆；成对或链状	−	+	分解糖	肠道菌群
埃格斯菌属	不规则杆状；成短链	−	+	分解糖	牙脓肿伴菌血症；脓胸
Eisenbergiella	波状，中等，长杆，或丝状，末端锥形	−	−	不分解糖	菌血症
真杆菌属	多形性	−	v	分解糖	口腔感染；多种感染
栖粪杆菌属	多形杆状	−	−	分解糖	肠道菌群
产线菌属	短杆，规则	−	(+)	不分解糖	口腔感染
解黄酮菌属	直或微弯杆状	−	(+)	不分解糖	各种感染
霍尔德曼菌属	短杆；成对或链状	−	(+)	分解糖	肠道菌群
Lachnoanaerobaculum	带隆起的弯曲和丝状杆菌	−	(+)	分解糖	口腔和肠道菌群
毛螺菌属	弧形或螺旋杆状；末端尖细	−	+	分解糖	肠道菌群
乳杆菌属	短或长的细杆菌；成链	+/−	+	嗜酸	菌血症，心内膜炎，腹腔脓肿，多种感染
Marvinbryantia	短杆；成对或短链	−	+	需甲酸	肠道菌群
难养杆菌属	短杆	−	+	不分解糖	口腔感染
Moryella	长杆状；末端尖细	−	(+)	分解糖	口腔和肠道菌群；脓肿
口腔杆菌属	细长杆状，卵圆形；成对	−	−	不分解糖	鼻窦感染(罕见)

（续 表）

菌名	细菌形态	耐氧性[a]	革兰染色[b]	其他特性	临床相关性
假枝杆菌属	多形性；成对	−	+	分解糖	口腔感染
鲁滨逊菌属	卵圆形或短杆状；单个或成对	−	+	分解糖	多种感染（罕见）
罗斯伯里菌属	细长，多形，杆状	−	v	分解糖	肠道菌群
沙特尔沃思菌属	短杆或微弯；单个，成对或短链	−	+	分解糖	口腔感染；1例心内膜炎报道
细小杆菌属	直杆状或微弯；单个或成对	−	+	分解糖	菌血症；各种感染
Stomatobaculum	长杆状，常有膨大；单个或成链	−	（+）	分解糖	口腔菌群
Subdoligranulum	高度多形性，球状，水滴状	−	−	分解糖	肠道菌群
苏黎世杆菌属	不规则，长杆；成长链	−	+	分解糖	肠道菌群；菌血症（罕见）

注：[a]+/−．属内细菌耐氧能力不同；−．属内细菌均严格厌氧。[b]+．阳性；−．阴性；v．多样性；（+）．用原始方法脱色

（一）放线菌门

1. 放线菌属 放线菌属是人体黏膜表面的定植菌[81]。但因外伤或手术而导致这些细菌侵入深部组织，或者黏膜表面被异物破坏，都可能引起感染。放线菌病是肉芽肿性疾病，在成年患者中更常见，也可见于儿童[82]。常伴随窦道的形成，通常根据临床和组织病理学评估来诊断。典型的放线菌病与硫黄颗粒有关，但不是所有脓液都存在硫黄颗粒。显微镜下可以看到，硫黄颗粒具有革兰阳性分枝杆菌的特征性聚集，主要被多形核细胞包绕[83]。然而，放线菌病几乎都是混合感染：94.5%的颈面部放线菌病可同时培养出其他细菌，47.6%的患者需氧菌和厌氧菌感染并存[84]。有75%～95%的放线菌病病例合并其他细菌的感染，除了其他需氧菌和（或）厌氧菌外，伴放线凝聚杆菌（*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*）和咽峡炎链球菌群（anginosus group streptococci）常常被同时分离出来[85]。

放线菌病通常引起颌面部、胸部和腹盆部感染。最常见的是颌面部感染，占所有放线菌病的50%以上。不良的牙齿和口腔卫生是感染的危险因素，放线菌病可继发于未经治疗的龋齿、拔牙或外伤。硬腭是放线菌病非常罕见的感染部位。放线菌引起的双膦酸盐相关的颌骨坏死在肿瘤患者中已有报道[86]。肺部放线菌病继发于口咽分泌物的吸入，也可能是血源性的或从其他部位直接扩散引起的[87]。肺部放线菌病的诊断常常由于起始临床表现不特异而延误。一项研究显示，1/3的胸部放线菌病被误诊为恶性肿瘤[88]。除肺癌外，胸部放线菌病的鉴别诊断还包括导致肺炎的各种典型病因，包括肺结核。该病可发展为脓胸，脓肿形成于胸壁，紧接着侵犯周围的骨结构[89]。大多数盆腔感染发生在使用宫内节育器（IUD）的妇女[90]。腹部感染最常见于疾病或手术引起的肠穿孔后[91]。

在放线菌属的成员中，衣氏放线菌（*Actinomyces israelii*）、戈氏放线菌（*A. gerencseriae*）和格雷文尼放线菌（*A. graevenitzii*），以及丙酸丙酸杆菌被认为与经典放线菌病最相关[82]。值得注意的是，放线菌除了可以引起典型放线菌病外，还可引起皮肤、肌肉、骨骼、心包和中枢神经系统感染及播散性感染。放线菌引起的角膜炎、眼内炎和泪小管炎也有报道。放线菌引起的肉芽肿性乳腺感染成为了一种新的临床疾病[92]。放线菌还与各种牙齿和口腔感染有关，包括龋齿、牙髓感染、牙源性脓肿及种植牙有关的感染[93-96]。在牙科手术后，可以在血流中检测到口腔的放线菌[97]。使用厌氧培养方法，常常可以从成年囊性纤维化患者的痰标本中分离出放线菌，但其临床意义尚不清楚[98]。

临床感染最常分离的放线菌是苏黎世放线菌（*A. turicensis*）、雷丁放线菌（*A. radingae*）和纽氏放线菌（*A. neuii*）。它们存在于多种软组织感染中，包括肛周、腹股沟、腋窝、乳腺和耳周脓肿[99-100]。从这些软组织感染中也可分离出欧洲放线菌（*A. europaeus*）、芬克放线菌（*A. funkei*）、乔治放线菌（*A. georgiae*）和蒂莫内放线菌（*A. timonensis*）。此外，已从感染的髋关节假体中分离出内氏放线菌（*A. naeslundii*）和衣氏放线菌[101-102]。包括卡迪夫放线菌、戈氏放线菌、内氏放线菌、龋齿放线菌和泌尿生殖道放线菌在内的多种放线菌都与宫内节育器（intrauterine devices，IUD）感染有关，而衣氏放线菌和苏黎世放线菌最

为常见[103-104]。已证实麦尔放线菌(*A. meyeri*)可引起肺放线菌病,还可向其他器官播散[105]。由衣氏放线菌和麦尔放线菌引起的心包炎病例已有报道[106]。由于迄今为止报道的牙齿放线菌(*A. dentalis*)、人放线菌(*A. hominis*)、香港放线菌(*A. hongkongensis*)、居鼻放线菌(*A. nasicola*)、居口放线菌(*A. oricola*)和牙根放线菌(*A. radicidentis*)的人类临床分离株数量较少,因此这些细菌的自然定植部位和临床的关系尚未确定。

影响我们了解放线菌病和放线菌感染流行病学的一个主要障碍是,大多数已发表的研究并未使用分子方法鉴定到种[84]。因此,应谨慎解释已鉴定的种与疾病的关系。在最近发表的一项研究中,对所有从侵入性标本中分离出来的放线菌都进行了16S rRNA基因测序,结果如下[107]:格雷文尼放线菌(*A. graevenitzii*)仅分离自肺液或组织中。所有雷丁放线菌(*A. radingae*)均从胸部的皮肤和软组织感染中分离出来,而大多数纽氏放线菌(*A. neuii*)感染则来自皮肤和软组织脓肿。多数血流感染是由龋齿放线菌引起的。衣氏放线菌和麦尔放线菌主要从中枢神经系统感染中分离出来。在脑脓肿标本中,通过16S rRNA基因扩增,然后进行NGS,通常会检测到多种放线菌(最常见的是麦尔放线菌)[108]。但是,这种检测结果的临床意义尚不完全清楚,因为这些患者中很大一部分没有分离培养出放线菌,也并未针对放线菌进行特异性治疗,但预后良好。很明显,还有其他的放线菌种有待明确,其中18%的肺部液体和血液培养的分离株未鉴定到种[107]。分离出放线菌并非意味着一定存在感染(包括放线菌病),在特定培养基中存在放线菌生长,其意义需要密切结合临床。

2. 放线棒菌属 斯氏放线棒菌(*Actinotignum schaalii*)是放线棒菌属(*Actinotignum*,旧称*Actinobaculum*)中导致人类疾病最常见的菌种。已有报道该菌引起菌血症、心内膜炎、富尼埃坏疽(译者注:会阴和肛周区域坏死性筋膜炎)、脓肿、蜂窝织炎、椎间盘炎和脊柱炎[109-110]。绝大多数为尿路感染,其中老年人最常见。但有证据显示,这种细菌也可引起儿科患者的尿路感染[111-113]。斯氏放线棒菌(*A. schaalii*)是尿路感染病原菌之一,其培养结果的解释更为复杂[114]。该菌是从泌尿生殖道拭子中检测出来的,而不是来自粪便拭子[115]。重要的是,由这些细菌引起的尿路感染的实际患病率可能被低估了,这是由于体外分离需要在有二氧化碳的情况下或厌氧条件下培养至少48 h,而大多数实验室进行常规尿培养时都没有满足这些条件。

由于临床医生不熟悉这些细菌的临床意义,会认为血培养中分离出这些细菌并不重要[116]。另一个阻碍对这些细菌致病性认识的原因是,当前表型鉴定系统在传统意义上是不能准确鉴定出这些细菌的。斯氏放线棒菌引起的菌血症病死率为16%,50%以上的患者伴有严重脓毒症。然而,这可能是由于许多感染该菌的患者年龄较大,并伴有合并症所致[117]。马赛放线棒菌(*A. massiliense*)与软组织脓肿[118]有关。从一名患有慢性肾衰竭的患者中分离出了尿放线棒菌[119],并且尿放线棒菌和血液放线棒菌(*A. sanguinis*)的菌血症病例已有报道[117]。

3. 动弯杆菌属 动弯杆菌属是革兰染色不定、菌体弯曲的阳性杆菌,可以在女性阴道样本中检测到。柯氏动弯杆菌(*M. curtisii*)更容易在患有BV的妇女阴道样本中检测到,而使用分子方法也可以在未患病女性中检测到该菌[120]。在一项研究中,通过PCR检测变性患者的新生阴道样本,高达82%的柯氏动弯杆菌呈阳性[121]。有证据表明,从宫颈中分离的柯氏动弯杆菌与从阴道分离的菌株相比,其引起炎症的能力有所不同。已从乳腺脓肿和菌血症的患者中分离出柯氏动弯杆菌[6,122-124]。该菌也疑似与自发早产有关[125]。羞怯动弯杆菌(*M. mulieris*)菌体通常比柯氏动弯杆菌长,在没有BV的女性阴道中很容易检测到。在肝脓肿和腹腔脓肿的报道中也描述了羞怯动弯杆菌引起的生殖器外感染[126-127]。

4. 小弯菌属 尽管坎布里亚小弯菌的自然定植部位尚不清楚,但该菌已从多种感染中分离出来,包括宫内节育器感染及脑脓肿、耳后脓肿、颌下脓肿和乳腺脓肿[8,128]。坎布里亚小弯菌也能引起皮肤和软组织感染,腹股沟部位的脓肿最常见。最近描述的该属的第二个成员——人小弯杆菌(*V. anthropi*)[9],已经从尿、窦道、阴道及脓肿中分离出来。无论是表型鉴定,还是基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS),都不能鉴定这两种细菌。因此,直至截稿,该菌的鉴定仍需要通过16S rRNA基因测序[129]。

5. 皮肤杆菌属(*Cutibacterium*)及相关属 皮肤的丙酸杆菌群，现在被重新分类为皮肤杆菌属(*Cutibacterium*)，是皮肤的正常菌群。然而，这些细菌也可以在胃肠道、泌尿生殖道、口腔[130]和约20%的被狗和猫咬伤的感染伤口[131]中检测到。在成人囊性纤维化患者的痰中也可以检测到痤疮皮肤杆菌，但其临床意义尚不清楚[98]。虽然这些细菌经常被临床实验室视为污染菌而不予考虑，但近年来人们越来越重视它们作为病原菌的作用[132]。特别是，痤疮皮肤杆菌在体内异物表面形成生物被膜的能力已得到广泛关注。因此，痤疮皮肤杆菌已成为神经外科分流术感染的重要原因，同时也是乳房植入物、人工晶状体(角膜炎)、脊柱植入物和心脏设备(即人工瓣膜心内膜炎及植入式心脏复律除颤器和起搏器)的感染因素[133-139]。1/3的痤疮皮肤杆菌心内膜炎合并心脏内脓肿，这可能是由于最初分离到痤疮皮肤杆菌被认为无关紧要而延迟治疗造成的[140-142]。由痤疮皮肤杆菌引起的天然瓣膜性心内膜炎病例也有报道[140]。

可以说，痤疮皮肤杆菌作为人工关节感染(PJI)病原体的作用关注最多。这些感染通常延迟发病(即关节置换术后3个月以上)，临床表现不明显，疼痛常是唯一的症状[143-145]。痤疮皮肤杆菌常定植在人体上半身的皮脂腺和毛囊中，因此，肩关节感染比髋关节和膝关节感染更为常见[130]。感染更多见于男性，他们往往有较高的细菌载量[143,146]。从接受肩关节修复手术的患者中分离出这种细菌的意义很复杂，因为，该菌很容易从接受肩关节成形术或关节修复成形术[147]的患者外科切口中分离出来，包括预防使用抗菌药物的手术患者[148]。有意思的是，从深部分离的痤疮皮肤杆菌与从表层分离的菌株，在生物被膜产生能力方面有所不同，可能属于不同的系统发育类型，甚至可能是不同亚种[149-150]。越来越多的证据表明，痤疮皮肤杆菌可能在骨折固定不愈合中发挥作用[151-152]，这也得到了动物模型数据的支持[153]。

也有报道其他皮肤杆菌与PJI有关。尽管痤疮皮肤杆菌很少引起髋关节和膝关节的PJI，但最近报道了一系列由贪婪皮肤杆菌(*Cutibacterium avidum*)引起的PJI，主要发生在假体髋关节和膝关节[154-155]。引起感染的贪婪皮肤杆菌为β溶血。贪婪皮肤杆菌引起的人工瓣膜心内膜炎已有报道，虽然该菌的感染远远低于痤疮皮肤杆菌[156]。从人工瓣膜心内膜炎、乳腺、腹部、脾，肛周脓肿及骨髓炎患者[157-160]中也分离出了贪婪皮肤杆菌。已从PJI、心内膜炎、葡萄膜炎和术后眼内炎患者中分离出了颗粒皮肤杆菌[161-163]。从肩部PJI患者中分离出了"*C. humerusii*"。如果只进行斑点试验(即触酶和吲哚试验)，该菌会被误认为是痤疮皮肤杆菌，但通过16S rRNA基因测序可以将其和痤疮皮肤杆菌区分开来[11]。

嗜淋巴丙酸微菌与尿路感染有关。据报道，2例老年男性患者，其尿在长时间厌氧培养72 h后，分离出$>10^5$ CFU/ml嗜淋巴丙酸微菌[12,164]。宏基因组学研究为该细菌的尿路来源提供了支持，并且已经报道了一例混合感染的菌血症(即嗜淋巴丙酸微菌与斯氏放线棒菌的混合感染)[165]。该菌亚硝酸盐利用试验阳性，但在鉴定系统中硝酸盐还原试验呈阴性。无害产丙酸菌(以前的无害丙酸杆菌)是皮肤菌群的一部分[13]，没有人类感染的报道。丙酸假丙酸杆菌与放线菌病有关，也有报道其引起口腔和眼部感染[166-167]。产酸丙酸杆菌已从人类口腔中分离出来，微生物组学研究表明该菌可能在龋齿中发挥作用[168-169]。

6. 双歧杆菌属及相关细菌 双歧杆菌属是人类胃肠道和阴道的正常菌群。这类细菌占母乳喂养婴儿肠道菌群的80%以上，而占成人肠道菌群的比例不到6%[170]。过去认为双歧杆菌属细菌(主要是齿双歧杆菌)与龋齿相关[171]。已有报道这类细菌引起特定年龄(年幼和老龄)患者的菌血症，而且多数是混合感染[170]。使用双歧杆菌作为益生菌，可降低极早产儿坏死性小肠结肠炎的发生率及全因病死率[172]。然而据报道，全基因组测序(WGS)显示的菌血症的菌株与这些患者使用的益生菌制剂中的菌株遗传基因相同[173-174]。值得注意的是，发生这种情况的频率可能会被低估，因为在该患者人群中通常不进行厌氧血培养。类似地，在造血干细胞移植受体中也报道了益生菌给药引起的继发感染[175]。大多数报道的菌血症与长双歧杆菌有关，与该菌相关的还包括腹膜炎、中耳炎、心包炎、肺炎和腹腔脓肿[106,176-177]。短双歧杆菌与菌血症、脑室腹腔分流术感染、扁桃体周围脓肿和腹膜炎有关的病例已有报道[178-179]。由斯卡多维双歧杆菌引起的复发性尿路感染已有报道，并从血液和髋关节标本中分离出该菌[180]。斯

卡多维双歧杆菌有时出现较弱的溶血性，菌体偶有弯曲。

尽管广栖异斯卡多维菌经常出现在尿路感染，但异斯卡多维菌培养的临床意义还不是很清楚[181]。主要发生在女性患者中，菌量可大于 10^5 CFU/ml[182]。尽管这种 α 溶血的细菌可以在含 CO_2 的有氧环境中生长，但是在 MALDI-TOF MS 出现之前，该菌的感染可能被低估了，因为这种细菌很难用表型鉴定系统进行鉴定。广栖异斯卡多维菌还可从其他部位分离出来，包括血液、唾液、肺和主动脉瓣脓肿[181]。齿垢副斯卡多维菌(*Parascardovia denticolens*)、意外斯卡多维菌(*Scardovia inopinata*)和魏格斯斯卡多维菌(*Scardovia wiggsiae*)与龋齿有关[171,183]。此外，还从注射吸毒者的伤口培养物中分离出了魏格斯斯卡多维菌[183]。

7. 结肠杆菌纲

(1)柯林斯菌属：最近从一名混合菌败血症患者分离出了柯林斯菌，并已通过 VITEK ANC 卡、Bruker MALDI Biotyper 和 VITEK MS 准确鉴定出该菌(S. Butler-Wu，尚未发表)，但这种细菌引起的感染仍未被广泛报道。

(2)陌生菌属：陌生菌属细菌是生长缓慢的厌氧菌，其中一些细菌与牙髓脓肿和牙周炎等牙齿感染有关(如极小陌生菌和龈裂陌生菌)。而其他研究表明，这些细菌对口腔健康是有益的[184]。也可以使用分子方法从粪便中检测出陌生菌属细菌。龈裂陌生菌和 *A. deltae* 与菌血症有关[21,185]，后者发生在富尼埃坏疽患者中[21,186]。阴道陌生菌在 BV 中起重要作用[22,187]，并且与阴道加德纳菌生物被膜密切相关[188-189]。与柯氏动弯杆菌一样，在 BV 患者和变性女性患者的新生阴道中经常检测到阴道陌生菌[121]，但在没有 BV 的患者中也能检测到这种细菌[190]。据报道，在分娩期可检出阴道陌生菌[191]，也见于流产患者的输卵管卵巢脓肿[192]。有资料表明，阴道陌生菌可能与盆腔炎性疾病有关，也可能会增加持续性子宫内膜炎和宫颈上皮内瘤变的风险，尽管它们之间的关系还存在一定的争议[193-194]。这些问题在一定程度上是由于菌群失调引起的。有证据表明，高浓度的阴道陌生菌(DNA＞10^8 拷贝/ml)与早产有关[195]。从人体下半身的各种感染中均分离出微小陌生菌，并从呼吸道标本中分离到极小陌生菌。罕见的与 *vanB* 有关的高水平万古霉素耐药的微小陌生菌也有报道[196]。

(3)欧尔森菌属：已经描述的欧尔森菌属细菌有 4 种，其中 2 种是从人类分离的。丰富欧尔森菌和树胶欧尔森菌都与龋齿有关，见于牙周炎患者的龈下部位[197-198]。另外，还从 1 例患有急性胆管炎的菌血症患者[199]和 1 例由明串珠菌引起的慢性眼内炎患者[200]中分离出了树胶欧尔森菌。

(4)埃格菌属和相关细菌：埃格菌属细菌是人类肠道的定植菌。该菌属可引起人类的多种感染，包括椎间盘炎、腹膜炎、脑脓肿、化脓性肝脓肿、坏死性肺炎和骨髓炎[201-203]。尽管由迟缓埃格菌引起的菌血症(以前称为迟缓真杆菌)已了解清楚[199,203-204]，但研究表明，以前由"迟缓埃格菌"引起的菌血症事实上高达 50%是由中华埃格菌和香港副埃格菌引起的[205]。对于菌血症的患者，这些细菌感染的病死率为 20%～40%，其中 40%以上的病例为混合感染[206]。免疫抑制是这些细菌引起菌血症的重要危险因素。部分研究阐述了菌血症可导致癌症胃肠道转移的关系。从血培养中分离出埃格菌属或副埃格菌属细菌是否能快速辅助腹部影像诊断尚待确定[199,205]。一类尚未命名、与埃格菌属类似的细菌可能与 BV 相关[207]。

已经描述了 6 种斯莱克菌属细菌，但只有 3 种从人类中分离出来。在人的肠道中发现了 *Slackia equolifaciens* 和 *Slackia piriformis*。小斯莱克菌(*Slackia exigua*)与慢性牙周炎相关[184,208]，这种细菌也是口腔外化脓性感染的罕见原因，脓胸和混合性脓肿(乳房、扁桃体、肺和肠)也有报道[209-211]。继发于根周脓肿和化脓性脑膜炎的混合菌菌血症也认为是由该菌引起的[212-213]。最近的一项研究表明，埃格菌属可能与肠壁关系更密切，而斯莱克菌属与肠腔关系更密切[214]。

短隐杆菌是隐杆菌属的唯一成员，与牙周脓肿、慢性牙周炎和牙髓感染有关[184,208,215]。*Enterorhabdus* 包括 3 个菌种，是肠道菌群的成员。迄今为止，尚无人类感染这些细菌的报道[216]。同样地，专性厌氧菌产雌马酚阿德勒菌(*Adlercreutzia equolifaciens*)也已从人类粪便中分离出来[26]，但没有引起感染的报道。从人的粪便中分离出了 *Gordonibacter faecihominis* 和 *Gordonibacter urolithinfaciens*[28]，从菌血症患者中分离出了触酶阳性的 *Gordonibacter pamelaeae*[217]。

(二)硬壁菌门

1. 乳杆菌属　乳杆菌属(*Lactobacillus*)是人类微生物群的益生菌,但在儿童和成人中有时会成为条件致病菌(表 54-1)[218]。患者通常存在基础疾病,如恶性肿瘤、器官移植史、近期外科手术史或糖尿病[218-219]。最常从侵袭性感染中分离出的乳杆菌属细菌是鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*)、干酪乳杆菌(*L. casei*)、发酵乳杆菌(*L. fermentum*)、植物乳杆菌(*L. plantarum*)、嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)、唾液乳杆菌(*L. salivarius*)和类干酪乳杆菌(*L. paracasei*)。据报道,其他菌种也可引起感染,包括加氏乳杆菌(*L. gasseri*)、詹氏乳杆菌(*L. jensenii*)、混淆乳杆菌(*L. confusus*)、弯曲乳杆菌(*L. curvatus*)和唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)[218,220,221]。

乳杆菌属尤其与晚期龋齿有关[222-224],这类细菌偏爱 pH 较低的环境,为继发定植菌,会使现有病变加重[225]。据报道,乳杆菌属最常引起的临床感染是菌血症和心内膜炎(人工瓣膜和天然瓣膜),其中鼠李糖乳杆菌和干酪乳杆菌是主要感染菌[199,218-219,226]。口腔可能是主要入侵门户,是由不良的牙齿或牙科手术造成的[218]。外科手术或其他操作引起的胃肠道和泌尿生殖道黏膜损伤也可能是血流感染的来源[227-228]。例如,在接受泌尿生殖道手术的女性中发现了詹氏乳杆菌的感染[227]。乳杆菌属细菌也可引起许多其他感染,包括腹膜炎、绒毛膜羊膜炎、脑膜炎和腹腔内脓肿。重要的是,乳杆菌属经常与其他微生物一起被分离出来。最常见的是念珠菌属、肠球菌属和克雷伯菌属,而这种混合感染与全因病死率较高相关[218]。临床实验室会从无菌和非无菌标本中分离出常见的乳杆菌。对培养出该类细菌的临床解释必须考虑患者的病史和其他微生物学发现。需要注意的是,乳杆菌在特定环境下才具有致病性[218-219]。

人们担心食品中食用益生菌菌株可能导致一部分人患病。少数病例报道了因为大量食用乳制品可能导致的感染[218]。即使大量使用益生菌保健品,乳杆菌感染的实际风险仍然很低[229-231]。然而,在儿童和成人患者的败血症或心内膜炎病例中,已经报道了乳杆菌的益生菌菌株,如鼠李糖乳杆菌 GG[232-234]。部分病例报道认为益生菌保健品剂量和摄入途径不合适是主要原因。需要注意的是,当益生菌摄入后而发生乳杆菌感染时,不能推定存在流行病学关联。通过一项分子分型的研究发现,来自患者血培养分离株和所服用益生菌配方的乳杆菌菌株是不同的[235]。

NGS 表明,正常的阴道微生物菌群由数量有限的细菌组成,主要是卷曲乳杆菌(*Lactobacillus crispatus*)或惰性乳杆菌(*Lactobacillus iners*),而加氏乳杆菌或詹氏乳杆菌并不常见。在发展为 BV 的过渡期仍然可以发现大量的惰性乳杆菌[236]。阴道菌群中乳杆菌减少和其他细菌增多是 BV 的特征,并且与阴道 pH 升高和 Nugent 评分异常有关[237]。

2. 真杆菌属和相关细菌　真杆菌属的定义尚不明确,但通常可以从口腔感染(包括慢性牙周炎)中分离出该菌属及其相关的硬壁菌门细菌(表 54-1),特别是通过使用营养丰富的培养基和延长培养时间[238]。由于它们存在于口腔中,因此可以从人类咬伤伤口感染中分离出各种真杆菌和相关菌种[131]。在女性生殖道感染中发现了缠结真杆菌(*Eubacterium nodatum*)[239]。在有重要临床意义的菌血症病例中,检测到了纤细真杆菌(*Eubacterium tenue*)和卡兰真杆菌(*Eubacterium callanderi*),它们为环境厌氧菌[199,240]。从之前的真杆菌属成员中产生了许多新的菌属。在真杆菌科中,人粪厌氧棒形菌(*Anaerofustis stercorihominis*)已从人类粪便中分离出,但是迄今未发现人类感染。在口腔中可以检出不解乳假枝杆菌(*Pseudoramibacter alactolyticus*),其与多种口腔感染相关,包括根尖周炎、根尖周脓肿、龋齿、牙髓感染和根管感染[30]。

已从血培养中分离出了香港触酶杆菌(*C. hongkongensis*)[33],文献报道的病例以菌血症、败血症为主[241-242],病死率高[33,243]。大多数患者有基础疾病,多数是胃肠道疾病(如阑尾穿孔和肠穿孔继发的菌血症)。API 20A 系统不能鉴定该菌,MALDI-TOF MS 对该菌的鉴定能力也是未知的[33]。

通过微生物群分析,在人类和动物中发现了毛螺菌科的大多数菌种,但它们很少与人类感染有关。厌氧棒状菌属是健康肠道菌群的主要组成部分[34,37-38,244]。粪厌氧棒状菌与一例旁路移植物感染及菌血症有关[245]。但迄今为止,尚未报道该

菌属引起的其他感染。*Catonella morbi* 是口腔微生物群的组成部分，已在感染的牙周组织中与其他厌氧菌一起被检出[246]。已有一例原发性瓣膜性心内膜炎是由 *C. morbi* 引起的[247]。在为数不多的 *E. tayi* 相关报道中，所有分离株均来自血培养，同时从其中一名患者的阑尾组织中分离出该菌[40,41]。人们认为，毛绒厌氧杆菌属细菌是口腔和肠道菌群的成员，但它们与疾病之间的关系还没有得到很好的证实。在早产儿的血液和羊水样本中已检测到这类细菌[248]。已经从牙菌斑中分离出了沙状毛绒厌氧杆菌，并在牙髓混合感染中检测到该菌[249]。*Lachnoanaerobaculum umeaense* 是在一名腹腔疾病患者的小肠中分离出来的[36]。从大腿、臀部和腹腔脓肿中分离出了 *Moryella indologenes*[46]。研究发现，该细菌存在于人类肠道和口腔微生物群中[250-251]。鼻窦口腔杆菌最初是从儿童上颌窦脓液中分离出来的，是混合感染的一部分[48]。该菌属是与假牙臭味有关的微生物[252]。最先从口腔中的牙菌斑和与牙周炎相关的区域中分离出了沙特尔沃思菌属细菌[53]。已报道了一例由卫星沙特尔沃思菌引起的心内膜炎，患者先前患有牙龈疾病[253]。

皮奥里亚鲁滨逊菌（*Robinsoniella peoriensis*）最初是在猪粪中发现的，但也来自人类足跟深部伤口和血液[49]。此后在健康早产儿的粪便菌群中发现了该菌[254]。尽管少，但鲁滨逊菌已在人类的多种感染中有记录，包括菌血症、腹腔内感染、创伤后和手术后伤口感染及 PJI[255-258]。既往有一个病例认为粪便艰难拟梭菌谷氨酸脱氢酶抗原检测存在交叉反应，导致其粪便谷氨酸脱氢酶阳性而艰难拟梭菌产毒培养为阴性。从粪便中分离出了皮奥里亚鲁滨逊菌，通过 WGS 发现该菌可能有 *gdh* 基因，但没有艰难拟梭菌毒素基因[259]。

毛螺菌科的其他成员尚未在人类感染中发现。从人粪便中分离出了 *Marvinbryantia formatexigens*、*Dorea longicatena* 和 *D. formicigenerans*[35]。毛螺菌属中的 *L. multipara* 和裂果胶毛螺菌（*L. pectinoschiza*）最初是从动物肠内容物中分离出来，认为是人类肠道正常菌群的一部分[42-43,260]。罗斯伯里菌属是在人类粪便中发现的，由于具有产生丁酸盐的能力，因此被认为与健康的肠道微生物群有关[51-52,261]。*Stomatobaculum longum* 最初是从人口腔中分离出来的[54]。

3. 消化链球菌科和瘤胃菌科　绒毛产线菌（*Filifactor villosus*）与牙周炎、根管感染伴根尖周脓肿及牙髓感染有关[56]。该菌在牙周炎患者的牙周袋中发现率很高，但在没有这种疾病的受试者中却不存在[262]。这种细菌是从人类猫咬伤感染的伤口中分离出来的[263]。按照以前的分类，该菌属于真杆菌属，难以鉴定，精氨酸刺激其体外生长。最近发现的龈沟产线菌（以前称为龈沟梭杆菌）也与一系列口腔疾病有关，包括牙周炎、牙髓炎和种植体周围炎[262]。

人结肠厌氧棍状菌是瘤胃菌科的一种，是从人类粪便中分离出来的[32]，不过曾有 1 例菌血症的病例报道[264]。有趣的是，最初并未发现结肠厌氧棍状菌的芽胞，但随后在菌血症的报道中观察到了芽胞。从人类粪便中分离出了 *Subdoligranulum variabile*，尚未见感染病例的报道[58]。厌氧棍状菌属和 *Subdoligranulum* 细菌革兰染色为阴性，但它们具有革兰阳性菌的细胞壁，因此对万古霉素敏感，对黏菌素耐药。

普拉栖粪杆菌是栖粪杆菌属的唯一成员，是肠道菌群的一员，占健康成年人粪便菌群总数的 5%。这种细菌是人类肠道内丁酸盐的主要生产者，而丁酸盐是维持肠道健康生理的重要物质[265]。肠道菌群失调与该菌含量减少有关，继而在多种肠道疾病的起因中扮演重要作用，包括溃疡性结肠炎和克罗恩病等肠道疾病[266]。

4. 未归类的菌属　迄今为止，在梭状芽胞杆菌纲中，还有 3 个菌属未归到任何一个科：布劳特菌属（*Blautia*）、难养杆菌属（*Mogibacterium*）和解黄酮菌属（*Flavonifractor*）。从牙周病患者及感染的根管和舌斑中分离出了 5 种难养杆菌[184,267-268]。尽管可以在人的粪便中检测到这些细菌的 DNA，但还未发现该菌属引起的口腔外感染[269]。微生物群分析显示，与阑尾正常者相比，阑尾炎患者的难养杆菌属含量有所增加[270]。已从血液培养物、腹腔内脓液及皮肤和软组织感染中分离出了普劳特解黄酮菌[61]。已经从粪便中分离出了全部 12 种布劳特菌，但没有人感染该菌属的报道。有人认为，这种细菌可能在防止移植物抗宿主病的病死率方面发挥作用，大量的布劳特菌与提高患者的总体生存率有关[271]。

5. 丹毒菌纲(Class Erysipelotrichia)　缓慢布雷德菌是布雷德菌属的唯一成员，与牙周炎和脓

肿有关[215]。有趣的是，该菌也从一名假体周围髋关节感染的患者中分离出来，该患者的关节置换术已有 26 年[272]。微生物群分析显示，与正常阑尾相比，阑尾炎患者的布雷德菌含量增加[270]。三冈链形杆菌(*Catenetbacterium mitsuokai*)是粪便微生物群的一部分，该菌是链杆菌属的唯一成员[66]，没有人类感染这种细菌的报道。从粪便中分离出了 *Coprobacillus cateniformis*，无人类感染的报道[67]。霍尔德曼菌属(*Holdemania*)包括线形霍尔德曼菌(*H. filiformis*)和马赛霍尔德曼菌(*H. massiliensis*)，是从人类粪便中分离出来的，迄今无感染报道[69-70]。

链状埃格斯菌(*Eggerthia catenaformis*)以前被归类为乳杆菌属，是埃格斯菌属的唯一成员。个别病例报道了与牙周脓肿(合并咽峡炎链球菌群)[273]相关的菌血症及肠道和胸腔积脓或脓肿[274]。该菌分离自唾液中，并通过 Bruker Biotyper MALDI-TOF MS 系统进行了正确鉴定[273]。莫氏细小杆菌最初是从粪便中分离出来的，很明显目前该菌与牙髓脓肿有关[275]。此外，在患有基础疾病和恶性肿瘤患者中，有许多菌血症的报道[276]。已有报道该菌还可引起毛囊、直肠周围和术后皮下脓肿[277]。商品化的表型鉴定系统不能鉴定莫氏细小杆菌。已从一名急性阑尾炎患者的血培养中[72]及从人的粪便中分离出了血苏黎世菌[278]。

四、标本的采集、运输和储存

本章中所描述的许多细菌是人类正常菌群的一部分，属条件致病菌。厌氧标本接收原则适用于这一类细菌(第 19 章)。适合培养这类细菌的标本包括无菌采集的外周血，组织活检标本，抽吸物和体液(如脑脊液、关节液和脓液)。当皮肤黏膜部位感染时，标本的采集是具有挑战性的，应尽量避免感染周围微生物的污染。强烈建议不要使用拭子[279]。如怀疑 PJI，应培养假体周围组织样本及假体本身。美国传染病学会(IDSA)指南建议，在怀疑 PJI 时，应送 5 或 6 个假体周围标本进行培养[280]。将标本运输到临床实验室应采用厌氧运输技术。

五、直接检测

传统的显微镜检查在确定放线菌病的诊断中起着关键作用。肉眼观察脓液中的硫黄样颗粒，压碎并经过革兰染色后置于显微镜下观察，可见大量革兰阳性的分枝状菌丝，是这种感染的确诊特征。但是需要注意的是，并非所有放线菌病都存在硫黄颗粒。在放置宫内节育器(IUD)妇女的宫颈涂片中，有分枝的革兰阳性菌可能提示放线菌感染[281]，然而多项研究表明，在无症状的宫内节育器妇女宫颈巴氏涂片中可见放线菌样细菌[282-283]。阴道涂片的革兰染色用于 BV 的实验室诊断，其诊断标准基于标准化的 Nugent 评分系统[284]。对于其他感染，革兰染色可在指导培养范围方面发挥关键作用。更重要的是，这些结果可以提示，存在一个混合感染过程，使医生能够确保经验性抗菌治疗覆盖厌氧菌，包括革兰阳性无芽胞菌。实验室人员和临床医生都应意识到不典型革兰染色形态的意义，如球菌样的牙根放线菌类似于葡萄球菌[94,285]，以及某些革兰阳性细菌(如许多真杆菌样菌种)呈现革兰阴性表现[239]。

六、分离培养

标本应及时处理以保持微生物活性。应使用合适的培养基，包括富含氯化血红素和维生素 K_1 的标准厌氧血琼脂。在第 20 章中讨论了用于体外分离厌氧菌的琼脂培养基。可以根据采集部位的预期微生物，或在咬伤的情况下，根据攻击者(人类或动物)的口腔菌群，使用多种选择性培养基。必要时，使用新鲜的或预还原的培养基，包括苯乙醇血琼脂和(或)黏菌素-萘啶酸血琼脂，可用于提高革兰阳性菌的检出率[286]。许多发酵菌可以添加 0.5%精氨酸以促进其在固体培养基上的生长[287]。一般来说，双歧杆菌属和乳杆菌属细菌可以使用酸性琼脂培养基，如 Rogosa 或 MRS(deMan，Rogosa，Sharpe)琼脂进行选择性培养，而一些对营养要求严格的菌株在这些培养基上不生长。从临床标本来看，大多数乳杆菌属细菌在常规血琼脂和血液培养基上生长良好[114,288]。

许多革兰阳性无芽胞厌氧杆菌能够在有氧条

件下生长，但推荐厌氧培养以优化细菌分离率。形成厌氧培养环境的方法多种多样（如 Anaeropak、Anoxomat 等），厌氧培养的原理和操作在第52章中进行了讨论。厌氧培养箱中的培养基可以在培养 24 h 后进行观察。但是，为了加强对生长缓慢且氧敏感的细菌检测，如果使用厌氧罐，建议在观察前培养 48 h[286]。当使用裂解厌氧培养基时，自动化血液培养系统中厌氧菌的检出率有所增加[289]。心内膜炎患者心脏瓣膜的研磨可提高厌氧菌的检出率[135]，尽管一些研究发现这一过程与污染风险增加有关[290]。商业化血培养系统之间在检出厌氧菌（包括革兰阳性无芽胞厌氧杆菌）方面存在差异[291-292]。

对于怀疑 PJI 的患者，假体本身和假体相邻部位的组织标本（即假体周围标本）都可以进行培养。对于这些类型标本的培养，有几个值得注意的特殊事项[293]，包括厌氧菌在内的细菌在假体材料上形成生物被膜，与假体周围组织和液体标本的培养相比，已证明细菌从假体上脱落可以提高细菌检出的敏感性[294-295]。最广泛报道的去除生物被膜的方法是对假体材料进行超声处理，在固体培养基上培养超声液，并使用适当的临界值区分由于污染导致的阳性结果与真阳性结果[294,296]。在袋子里对假体进行超声波处理会导致过度污染，因此应使用固体密封容器[297]进行。与单独接种于固体培养基相比，将超声波液接种于血培养瓶中，可进一步提高培养的敏感性，但不易区分污染[298]。超声波处理是一个相对费时费力的过程，因此对于一些实验室可能不适用。已提出用二硫苏糖醇进行预处理[299-300]，作为从假体材料中去除生物被膜的替代方法，尽管与超声处理相比，这种方法的可接受性尚不明确[301]。

将组织匀浆或研磨后接种到血液培养瓶中，也提高了假体周围组织培养诊断 PJI 的敏感性。与常规琼脂和肉汤培养相比，敏感性提高了29.5%（译者注：原文及参考文献为 47%，根据上下文校正）（分别为 92.1%和 62.6%）[302]。另外，已经证明与传统培养的工作流程相比，成本反而有所降低[303]。IDSA 指南建议，怀疑 PJI 的患者培养 5 个或 6 个假体组织标本[280]。但最近发现，与 4 个样本使用标准平板和肉汤培养基[304]相比，当将这些标本接种到血培养瓶中时，假体周围组织最佳样本数为 3 个。

人工关节标本培养的最佳培养时间一直存在争议，部分原因是关于体外培养痤疮皮肤杆菌需要延长的时间方面结果不一致[305-306]。最佳培养潜伏期尚未确定，许多研究认为需要 14 天的培养时间[307-308]。而其他研究表明，使用厌氧硫代乙醇酸盐时，7 天的培养时间就足够了[309]。然而，随后的一项研究表明，厌氧巯基乙酸盐和接种假体周围标本的血培养瓶，都需要 14 天才能培养出痤疮皮肤杆菌[302]。不同类型的血培养瓶对于痤疮皮肤杆菌的检出时间差异很大[310]。因此，从假体关节标本中分离痤疮皮肤杆菌的最佳孵育和培养时间仍有待充分论证。

七、鉴定

临床微生物学实验室进行厌氧菌分离鉴定的传统方法是通过表型鉴定试验。在革兰阳性厌氧无芽胞杆菌中，许多细菌表型试验是阴性，因此不能通过表型方法可靠地鉴定（如真杆菌属和其密切相关的菌种）。随着 16S rRNA 基因测序的出现，发现对于一些革兰阳性无芽胞厌氧杆菌，表型鉴定方法可能是有问题的。尽管如此，许多实验室多年来一直依靠市售的表型鉴定系统来鉴定厌氧菌，而目前正在被 MALDI-TOF MS 取代。

（一）初步鉴定

厌氧菌的初步鉴定主要依据耐氧试验（生长在空气或空气加 5% CO_2）、菌落形态、是否溶血、色素沉着和在长波紫外线（365nm 的波长）照射下的荧光性。菌落形态具有重要意义，如衣氏放线菌、格拉斯放线菌、居鼻放线菌、居口放线菌、丙酸丙酸杆菌、魏格斯斯卡多维菌和缠结真杆菌呈典型的"臼齿"形菌落。然而，本章所讨论的大多数菌种的菌落形态小且特征不明显。许多革兰阳性无芽胞厌氧杆菌能够产生荧光和（或）色素：紫外线照射下格雷文尼放线菌、丙酸丙酸杆菌和迟缓埃格菌显示橙色或红色荧光[166,311]，龋齿放线菌的典型菌落形态是粉红色或红色菌落[312]。但其他一些放线菌的某些种也产生色素，特别是在含兔血的琼脂培养基上，格雷文尼放线菌菌落颜色接近黑色，牙根放线菌为棕色菌落，而泌尿生殖道放线菌形成略带红色的菌落[313]。

革兰染色镜检细菌形态可用于厌氧菌的初步

鉴定。尽管如此，实验室人员还应注意那些特殊革兰染色形态的细菌，或者那些由于自身特性或由于容易过度脱色而染成革兰阴性的细菌。例如，最近描述的放线菌属的非分枝菌种[94,314]，以及龈沟产线菌和羞怯动弯杆菌，它们革兰染色常常为阴性。当将较旧的培养物用于染色时（大于3天），放线棒菌属、真杆菌属和其他密切相关的菌属革兰染色可变。革兰阳性菌染成阴性，可能是由于暴露于氧气，或是固定过程和相关试剂破坏了细胞壁的物理完整性。因此，可缩短染色前与空气接触的时间，以提高革兰染色结果的可靠性[315]。由于革兰阳性菌可能染成阴性，因此，可通过3%氢氧化钾溶液[316]或对特定抗菌药物敏感性[317]来确定革兰染色的准确性。革兰阳性菌通常对多黏菌素（10 mg）耐药而对万古霉素（5 mg）与卡那霉素（1 mg）敏感。还应考虑到乳杆菌属某些菌种（如鼠李糖乳杆菌）对糖肽类抗生素的天然耐药[318]。

另外，触酶（15%过氧化氢）、吲哚、硝酸盐还原和动力等快速鉴定试验，也可用于革兰阳性无芽胞厌氧杆菌的初步分群[319]。根据标本来源和分离培养的菌量便足以鉴定到属的水平。当在临床标本的纯培养中出现革兰阳性无芽胞厌氧杆菌，或是正常无菌部位分离到优势菌时，理想情况下应鉴定到种。

(二)生化试验

革兰阳性无芽胞厌氧杆菌在种水平上的鉴定，既往均基于糖发酵反应和酶谱特征，后者通过单独的诊断试验、荧光底物试验或预制的酶反应试剂盒进行。从多方面来看，这种方法是有问题的。首先，生长不足和反应的重复性差，导致生化反应结果难以判读。建议使用新鲜培养的细菌，并加大接种菌量进行生化反应，一些菌株需要延长培养时间（直至48 h）。其次，细菌分类学的改变，导致传统的生化方法在许多情况下缺乏足够的特异性以满足准确鉴定。例如，不能仅仅通过表型试验来区分内氏放线菌-黏放线菌群的成员[313]。本章讨论的许多菌属的生化反应如表54-2至表54-5所示。但是，这些反应所基于的研究很多仅报道了单个分离株或有限数量的分离株，而在随后的研究中，观察到了不同的反应结果。读者还应该注意，基于商品化鉴定系统（在下一段中描述）确定反应可能与表54-2至表54-5所示的结果有所不同。在鉴定许多放线菌和嗜酸乳杆菌复合体及相关菌种时，表型标准尤其不可靠[320]。在一项回顾性研究中，将16S rRNA基因测序应用于66个经生化鉴定为乳杆菌属的菌株，其中27%实际上是放线菌属、梭菌属、双歧杆菌属、魏斯菌属或肉食杆菌属（*Carnobacterium*）细菌[219]。

利用气-液相色谱法（GLC）测定细菌葡萄糖代谢中的主要挥发性脂肪酸终产物，是以前对已知细菌鉴定到属的重要方法。但是，使用该方法还需要延长细菌的培养时间[319]。此外，细菌脂肪酸的GLC分析和聚丙烯酰胺凝胶电泳检测蛋白质已应用于分类学，可以区分同一菌种内的菌株及同一菌属或科内的菌种。尽管GLC很实用，但在大多数临床实验室中并未广泛使用。

基于上述原因，是否具备商品化厌氧菌鉴定系统，已成为临床实验室提高鉴定厌氧菌能力的重要发展方向。从本质上讲，这些系统是微型化的测试酶和碳水化合物发酵情况的系统。许多厂家都可提供各种各样的这类产品，包括API ID 32A（bioMérieux，Marcy l'Etoile，法国），RapID Ana Ⅱ（Remel，Lenexa，KS），BBL Crystal Anaerobe ID试剂盒（Becton Dickinson Diagnostic Systems），以及VITEK 2 ANC ID卡（bioMérieux）。这些系统已被许多临床实验室广泛采用，因为它们比常规方法更简便，并且在许多情况下检测周期也非常快，有些系统仅需要4 h的孵育时间。与传统的生化方法一样，这些系统通常需要较大的接种量（3～4麦氏浊度）。这些系统的主要局限性在于，用来鉴定细菌的数据库代表性菌株的不足[321]。同样重要的是，对于已知的分离菌株，当用不同的商品化系统进行测试时，不同系统可产生不同的分析结果。

建议临床实验室中使用的鉴定系统能够正确鉴定>90%的待测菌株[322]。然而，系统性能的研究结果显示，革兰阳性无芽胞厌氧杆菌的性能各不相同。根据研究结果，这类细菌的种水平鉴定的准确率从<30%到>90%不等[323-324]。这些研究有很多局限性，缺乏足够的代表性来检测革兰阳性无芽胞厌氧杆菌，仅包括系统数据库所针对的细菌，只使用表型而非基因型作为参考鉴定方法。当被测细菌仅限于数据库中包含的细菌时，鉴

表 54-2 放线菌和与人类感染相关病原菌的生化特征[a]

菌种	耐氧	色素[b]	是否产		硝酸盐还原试验	七叶苷水解试验	是否产[c]			CAMP试验	是否发酵[d]				
			触酶	脲酶			α-Glu	β-NAG	β-Gal		Mal	Man	Raf	Suc	Tre
放线棒菌属															
马赛放线棒菌	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	v	ND	+
猪放线棒菌	−	−	−	+	−	−	+	+	−	−	+	−	−	−	−
Actinotignum															
A. sanguinis	+	−	−	−	v	−	+	−	−	−	v	−	v	v	−
A. Schaalii	+	−	−	−	−	−	+	−	−	Weak	+	−	−	v	v
A. urinale	(+)	−	ND	v	−	−	−	−	−	−	v	−	−	v	−
放线菌属															
卡迪夫放线菌	(+)	−	−	−	v	−	+	−	−	−	v	−	v	v	−
牙齿放线菌	−	−	−	−	−	+	+	−	+	−	+	−	+	+	+
欧洲放线菌	+	−	−	−	v	v	+	−	+	−	+	−	−	v	v
芬克放线菌	+	−	−	−	+	−	+	v	v	v	v	−	−	+	−
乔治放线菌	+	−	−	−	v	+	+	−	+	−	+	−	−	+	+
格拉斯放线菌	+	−	−	−	v	+	+	−	+	−	+	v	v	+	v
格雷文尼放线菌	+	+	−	−	v	−	v	+	+	−	+	−	v	+	v
人放线菌	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	ND
香港放线菌	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	ND	ND	−	ND	−
衣氏放线菌	(+)	−	−	−	+	+	+	−	+	−	+	−	+	+	+
约翰逊放线菌	+	−	v	v	+	−	+	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	v
马赛放线菌	+	−	−	−	+	ND	+	−	+	ND	+	−	−	+	+
麦尔放线菌	−	−	−	−	v	−	+	+	+	v	+	−	−	+	−
内氏放线菌	+	−	−	+	+	v	v	−	+	−	+	−	+	+	+
居鼻放线菌	(+)	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−
纽氏放线菌															
纽氏放线菌无硝亚种	+	−	+	−	−	−	v	−	+	+	+	+	v	+	v
纽氏放线菌纽氏亚种	+	−	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	v	+	v

（续 表）

菌种	耐氧	色素[b]	是否产		硝酸盐还原试验	七叶苷水解试验	是否产[c]			CAMP试验	是否发酵[d]				
			触酶	脲酶			α-Glu	β-NAG	β-Gal		Mal	Man	Raf	Suc	Tre
龋齿放线菌	+	+	−	−	+	v	−	−	+	−	+	−	−	+	−
居口放线菌	+	−	−	−	−	+	+	−	v	−	−	−	+	+	+
口腔放线菌	+	−	v	−	+	v	v	ND	v	ND	ND	ND	ND	ND	v
牙根放线菌	+	+	+	v	v	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+
雷丁放线菌	+	−	−	−	v	+	+	+	+	v	+	−	v	+	v
提蒙放线菌	+	−	−	−	−	+	−	−	−	ND	+	+	+	+	+
苏黎世放线菌	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	v	+	v
泌尿生殖道放线菌	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+
黏放线菌	+	−	+	v	+	v	v	−	v	−	+	v	+	+	v
小弯菌属															
V. anthropi	−	−	−	v	+	−	+	−	v	ND	+	v	−	ND	ND
坎布里亚小弯菌	(+)	−	−	−	+	−	+	−	v	ND	+	−	−	+	−

注：[a]+. 阳性；(+). 厌氧状态生长较好；−. 阴性；v. 可变的；ND. 无数据。[b]格雷文尼放线菌在布氏琼脂上无色素，但在兔血琼脂上几乎是黑色；然而，其他不产色素的放线菌在布氏琼脂上呈浅红色或浅棕色，在兔血琼脂上颜色较暗。[c]缩写：α-Glu. α-葡萄糖苷酶；β-NAG. β-*N*-乙酰-葡萄糖苷酶；β-Gal. β-半乳糖苷酶

[d]缩写：Mal. 麦芽糖；Man. 甘露醇；Raf. 棉子糖；Suc. 蔗糖；Tre. 海藻糖

表 54-3 临床常见丙酸杆菌的生化特征[a]

菌种	氧耐受性	触酶	吲哚	硝酸盐还原酶	七叶苷水解
皮肤杆菌属(*Cutibacterium*)					
痤疮皮肤杆菌	+	+	+	+	−
贪婪皮肤杆菌	+	+	−	−	+
颗粒皮肤杆菌	+	+	−	−	−
丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)					
产酸丙酸杆菌	−	−	−	−	−
产丙酸菌属					
无害产丙酸菌	+	+	−	v	−
丙酸微菌属					
嗜淋巴丙酸微菌	−	v	−	v	ND
假丙酸杆菌属					
丙酸假丙酸杆菌	−	−	−	+	−

注：[a]+. 阳性；−. 阴性；v. 可变因素；ND. 无资料

表 54-4 用于区分陌生菌和欧尔森菌的生化反应[a]

菌种	氧耐受	产物		硝酸盐还原	水解		酸性磷酸盐	β-Gal
		触酶	吲哚		七叶苷	精氨酸		
陌生菌属								
A. deltae	−	−	−	−	−	+	ND	−
化石陌生菌	−	−	−	−	−	ND	ND	ND
微小陌生菌	−	−	−	−	ND	+	−	−
极小陌生菌	−	−	−	−	v	−	+	+
龈裂陌生菌	−	−	−	−	v	v	+	−
阴道陌生菌	(−)[b]	−	−	−	−	+	+	−
欧尔森菌属								
丰富欧尔森菌	−	−	−	−	+	−	+	+
齿龈欧尔森菌	−	−	−	−	+	+	+	−

注：+. 阳性；−. 阴性；v. 可变因素；ND. 无资料；β-Gal. β-半乳糖苷酶。[b]最初阴道陌生菌被描述为兼性厌氧菌

表 54-5 人类真杆菌属样细菌的生化特征[a]

菌种	葡萄糖发酵	产物		硝酸盐还原	水解	
		触酶	吲哚		七叶苷	精氨酸
放线菌门						
产气柯林斯菌	+	−	−	−	v	v
肠柯林斯菌	+	ND	ND	ND	ND	ND
马赛柯林斯菌	−	−	−	−	−	+
粪柯林斯菌	+	ND	ND	ND	ND	ND
短隐杆菌	−	−	−	−	−	+
缓慢埃格菌	−	+	−	+	−	+
中华埃格菌	−	+	−	−	ND	+
香港副埃格菌	−	+	−	−	ND	+

（续　表）

菌种	葡萄糖发酵	产物		硝酸盐还原	水解	
		触酶	吲哚		七叶苷	精氨酸
Slackia equolifaciens	−	−	−	−	ND	+
小斯莱克菌	−	−	−	−	−	+
Slackia piriformis	−	−	−	−	−	+
硬壁菌门						
缓慢布雷德菌	+	−	−	−	−	+
三冈链形杆菌	+	−	ND	−	−	ND
短真杆菌	−	−	−	−	−	−
黏液真杆菌	+	−	−	−	+	v
细小真杆菌	−	−	−	−	−	−
缠结真杆菌	−	−	−	−	−	+
直肠真杆菌	+	−	−	−	+	−
Eubacterium saphenum	−	−	−	−	−	−
龈沟真杆菌	−	−	−	−	−	−
纤细真杆菌	Weak	−	+	−	−	ND
尤里真杆菌	Weak	−	+	−	−	−
龈沟产线菌*	−	−	−	−	−	+
绒毛产线菌*	−	−	−	−	−	ND
普劳特解黄酮菌	Weak	ND	−	−	−	ND
线形霍尔德曼菌	+	−	−	−	+	−
沙状毛绒厌氧杆菌	+	−	+	−	+	+
难养杆菌属某些种	−	−	−	−	−	−
不解乳假枝杆菌	+	−	−	−	−	−
皮奥里亚鲁滨逊菌	+	ND	−	−	ND	ND
卫星沙特尔沃思菌	+	−	+	−	+	−
莫氏细小杆菌	+	−	−	−	+	+

注：a +. 阳性；−. 阴性；v. 可变因素；ND. 无资料。* 译者注：已删去原文表格重复部分

定率较高[323]。当直接比较 BBL Crystal Anaerobe，RapID Ana Ⅱ和 VITEK 2 ANC 系统对于革兰阳性无芽胞厌氧杆菌的性能时，与 GLC 分析相比，这些系统鉴定到菌种水平的正确率分别为 29.4%、35.3% 和 52.9%。BBL Crystal Anaerobe，RapID Ana Ⅱ和 VITEK 2 ANC 系统对这些细菌鉴定错误率分别为 5.9%、47.1% 和 11.8%。将 VITEK 2 ANC 卡的检测结果与 16S rRNA 基因测序的结果进行比较时，分别有 60.1% 和 79.4% 的分离株被正确鉴定到属和种水平[326]。对于数据库中存在的细菌，鉴定到菌种水平的正确率为 90%，而对于系统数据库中不存在的细菌，鉴定错误率为 84%，只有 47% 被正确鉴定到属水平[326]。

既往研究主要包含放线菌属、乳杆菌属和皮肤杆菌属。因此，这些系统对于其他不常见菌属的性能知之甚少。在一项研究中，使用 API ID 32A 试剂盒可以轻松地将斯卡多维双歧杆菌与其他双歧杆菌区分开[180]。而在另一项研究在中，RapID Ana Ⅱ系统经常将斯卡多维双歧杆菌和长双歧杆菌错误地鉴定为放线菌，而 *A. omnicolens* 不能鉴定出来[181]。VITEK 2 ANC 卡可以准确地鉴定迟缓埃格菌和双歧杆菌属细菌[323]，但总的来说，它并不能可靠地鉴定放线菌属细菌。用 VITEK ANC 卡会将嗜淋巴丙酸微菌错误地鉴定为麦尔放线菌[165]。对于 RapID Ana Ⅱ系统，放线菌属在菌种水平上的错误鉴定很常见[327]。API ID 32A 和 RapID ANA Ⅱ（Remel）检测试剂

盒[187]，会将阴道陌生菌错误地鉴定为麻疹孪生球菌(*Gemella morbillorum*)。专门针对乳杆菌属设计的碳水化合物发酵检测试剂盒 API 50 CH (bioMérieux)在鉴定菌属水平方面很有价值，但在菌种水平上却缺乏特异性[328]。API 32A 将迟缓埃格菌(*E. lenta*)错误地鉴定为梭菌属(*Clostridium*)，将贪婪皮肤杆菌(*P. avidum*)错误地鉴定为痤疮皮肤杆菌(*P. acnes*)[329]。因此，实验室应注意到这些厌氧鉴定系统的局限性及可能的错误鉴定，在属水平上的错误鉴定可能对经验性抗菌治疗的选择产生不良后果。

(三)DNA 序列分析

16S rRNA 基因测序已成为准确鉴定菌种的"金标准"[330]，该基因 5′端约 500 bp 最为常用[331]。测序的第一步是从培养的菌株中提取 DNA，从革兰阳性菌中提取 DNA 通常需要采取额外方法来裂解细菌(如使用溶菌酶)，而革兰阴性菌通常不需要[332]。条件允许时，基因测序的整个过程也可以直接从临床样本开始[333]。经扩增的 DNA 产物测序后需要将获得的序列与数据库中的序列进行比对[334]。商业和公共数据库均可供比对使用。公共数据库(例如，NCBI)有时也不是足够准确，如某些序列可能会错误地或不恰当地分配给某一菌种甚至属。已有基于 16S rRNA 测序的细菌鉴定指南出版供大家使用，如一些科学论文和综述[335]。

尽管 16S rRNA 基因测序已成为细菌鉴定的"金标准"，但并非所有细菌都可以使用该基因进行分类鉴定。因此，对于一些细菌(如内氏放线菌，约翰逊放线菌和口腔放线菌)需要对其他管家基因(如 *metG*)进行测序，甚至需要进行多位点序列分析[336]。最近，WGS 成为一种有可能取代 16S rRNA 基因测序的技术，成为细菌鉴定的新的"金标准"，但是目前缺乏高度精确的 WGS 数据库[337-338]。16S rRNA 基因可能无法充分鉴别部分菌种，而 WGS 在细菌鉴定和菌株分型方面可显示出更强的鉴别能力。

与传统的 Sanger 测序相比，NGS 能够同时对多种 DNA 模板进行测序。因此，将 NGS 方法与 16S rRNA 基因 PCR 结合使用，可了解人体各个部位的微生物种群特征，并可以超出已有细菌分类目录而发现新菌种[339-341]。但用于 16S rRNA 基因扩增的引物及 NGS 方法本身会引入偏倚错误[342-343]。然而，WGS 和微生物组学的应用无疑将在未来临床微生物学领域做出巨大贡献。

(四)MALDI-TOF MS 方法鉴定

MALDI-TOF MS 使实验室能够快速、准确地鉴定常规分离的细菌和酵母菌，这使临床微生物学领域发生了重大变化[344-346]。与传统的表型鉴定方法相比，用 MALDI-TOF MS 进行常规鉴定，培养首日可鉴定的微生物数量显著增加(分别为 87.2%和 9.4%)[347]。在美国，FDA 批准了两种 MALDI-TOF MS 系统进行体外诊断(IVD)：MALDI Biotyper CA 系统(Bruker Daltonics GmbH，Bremen，德国)和 VITEK MS(bioMérieux；之前的 Shimadzu)。这两个系统均提供了科研(research-use-only，RUO)数据库，该数据库可以满足用户构建自定义数据库以实现个性化需求。其他 MALDI-TOF MS 数据库和系统可以在美国境外使用(例如，Andromas 数据库[348])，但此处不作讨论。关于临床实验室使用 MALDI-TOF MS 进行微生物鉴定的指南已经发布[349]。

对于厌氧菌的鉴定，包括革兰阳性无芽胞厌氧杆菌，MALDI-TOF MS 有许多重要事项需要注意。首先，细胞蛋白的提取是获得最佳性能所必需的，而这一要求对于 Bruker 系统中更为明显。这种提取可以在添加基质(靶板)之前用甲酸覆盖，也可以用试管提取(用乙醇、乙腈和甲酸)[350]。使用试管和靶板两种提取法可以改善 Bruker Biotyper 的提取性能[350]。其次，多项研究表明，通过降低菌种和属水平的鉴定分数阈值，可以提高 RUO 数据库的性能。用 Bruker Biotyper 鉴定放线菌时，使用分数≥1.9 而不是制造商建议的≥2.0，菌种水平的鉴定正确率为 92.5%(n=417)[351]。最后，数据库所覆盖和代表的微生物的广度和深度方面得到进一步发展，其性能也得以提高。MALDI-TOF MS 对厌氧菌的鉴定也似乎不受氧气暴露的影响[352]。

许多已发表的数据显示，MALDI-TOF MS 鉴定厌氧菌(包括革兰阳性无芽胞厌氧杆菌)是基于 RUO 数据库，而非 IVD 数据库。早期的研究表明，厌氧菌的鉴定率不高(Bruker 和 VITEK MS 系统分别为 67.2%和 49%)[353]。重要的是，这些研究显示未能鉴定出放线菌属、双歧杆菌属、

埃格菌属、布劳特菌属、细小杆菌属或苏黎世杆菌属细菌[353]，而衣氏放线菌被错误地鉴定为链状乳杆菌(现为链状埃格斯菌)[354]。使用低于制造商建议的鉴定分数阈值会提高鉴定率，但也会增加鉴定错误率(Bruker 和 VITEK MS 分别为 7.9% 和 1.4%)[353]。随后使用扩展数据库的研究表明，上述细菌鉴定的总体性能有所改善。当使用用户自建的数据库时，Schmitt 和同事成功地鉴定出了莫氏细小杆菌、布雷德菌属细菌、埃格菌属细菌、异斯卡多维菌和斯氏放线棒菌[355]。Bruker MALDI Biotyper 数据库的早期版本无法鉴定莫氏细小杆菌、苏黎世杆菌属和柯林斯菌属细菌[356]，而新的版本可以鉴定[351]。然而，数据库的扩展并不等同于鉴定所有微生物的性能都有所改进[如未鉴定出尿乏养菌，而难养杆菌属分离株被误认为是嗜盐梭菌(*Clostridium halophilum*)][355]。在检测临床分离的乳杆菌的研究中，Bruker MALDI-TOF Biotyper 系统在菌种水平上与 16S rRNA 基因 PCR 或基于测序鉴定的符合率为 85%～93%。不一致的主要原因是未使用 MALDI-TOF MS 鉴定或干酪乳杆菌被错误地鉴定为 *L. paracasei*[220,357]。

关于厌氧菌 IVD 批准数据库的性能研究很少，在这些研究中，革兰阳性无芽胞厌氧杆菌的代表性通常非常有限。VITEK MS v2.0 数据库系统正确鉴定了 265 株革兰阳性厌氧菌中的 91.5%；然而，只有 66% 到 86% 的放线菌属细菌被正确鉴定到菌种水平[358]。Bruker Biotyper CA 系统对厌氧菌菌种的鉴定正确率为 8.5%，错误率为 0.8%[359]。然而，这项研究仅包括了放线菌属和皮肤杆菌属的相应菌种，但并未描述各个属内部种特异性鉴定的性能。

将欧洲 IVD 批准的 Biotyper 和 VITEK MS 系统性能进行直接比较，放线菌科细菌的菌种水平鉴定正确率分别为 58.2% 和 60.7%[129]。在特定菌种的鉴定方面，系统之间存在很大差异。Bruker 系统对放线棒菌属(即现在的 *Actinotignum*)的鉴定正确率为 81%，而对于 VITEK MS，66.7% 没有鉴定出来，属水平的鉴定错误率也达到 33.3%。这两个系统菌种水平的鉴定率相似(约 60%)，但都无法鉴定小弯菌属。VITEK MS 系统更常发生菌属鉴定错误。许多放线菌细菌被错误地鉴定为贪婪皮肤杆菌，而 *Actinotignum* 细菌被错误地鉴定为一系列细菌(如无乳链球菌、麻疹孪生球菌、格氏李斯特菌和麦尔放线菌)。与直接用已有方法相比，靶细菌针对性(蛋白质)提取法更容易发生属水平鉴定错误。但是，使用更新的数据库(IVD 3.0)重新分析可以解决此问题。一项专门针对侵袭性放线菌的 VITEK MS 系统性能的大型研究发现，VITEK MS 仅鉴定出了 50% 的菌属和(或)菌种，反之，有 37% 无法鉴定，13% 的结果与鉴定率为 99% 的"极好的鉴定"结果不一致[107]。这些不一致的鉴定包括产气荚膜梭菌、大肠埃希菌、克氏库克菌、久坐皮肤球菌、溶血隐秘杆菌、缓症链球菌、*Geobacillus thermoglucosidasius*、耶氏副球菌、沃氏葡萄球菌和耐特西地西菌。

因此，在 MALDI-TOF MS 数据库充分优化之前，放线菌属细菌的鉴定应使用 16S rRNA 基因测序。

尽管有这些局限性，但 MALDI-TOF MS 的性能总体上优于商品化表型鉴定系统，有较高的菌种鉴定正确率和较低的错误率[360-363]。MALDI-TOF MS 使实验室能够快速、准确地鉴定出一些革兰阳性无芽胞厌氧杆菌，以前通常只能通过 16S rRNA 基因测序才能准确鉴定出这些细菌，包括斯氏放线棒菌和双歧杆菌属、异斯卡多维菌、陌生菌属、斯莱克菌属和埃格菌属细菌[185,351,364]。随着制造商数据库的进一步开发和扩展，MALDI-TOF MS 可能会使人们对这类细菌与疾病的相关性有更好的了解。MALDI-TOF MS 的用户应认识到，实验室使用的数据库中涵盖了哪些革兰阳性无芽胞厌氧杆菌，以及 MALDI-TOF MS 在鉴定这类细菌时存在的局限性。

八、抗菌药物敏感性试验

当怀疑患者是厌氧菌感染时，主治医生通常会进行经验性抗菌治疗[365]。革兰阳性厌氧无芽胞杆菌通常作为混合感染的一部分而分离，培养物中可以检测到多种(≥5)厌氧菌。在这种情况下进行个体药敏试验可能对临床无益，应该拒绝。相反，某种细菌为纯培养或占优势时，应对这些细菌进行药敏试验。是否需要进行敏感性试验，还应考虑样本来源(例如是无菌部位，还是可能被正常菌群污染的标本)。

临床和实验室标准协会(CLSI)和欧洲抗菌药物敏感性试验委员会(EUCAST)[366]都制定了厌氧菌的敏感性试验方法和折点。两个组织定义的折点均基于MIC法。当前,纸片扩散法仍不是一种可接受的厌氧菌药敏试验方法。就厌氧菌敏感性试验的指南而言,两个指南之间也存在几个重要差异。CLSI对革兰阳性厌氧菌和革兰阴性厌氧菌有联合的折点,而EUCAST分别设置了这两类厌氧菌折点。折点本身在EUCAST和CLSI中有所不同。例如,EUCAST没有头孢菌素或氟喹诺酮类的折点,而CLSI指南有相关折点。CLSI具有四环素的折点,而EUCAST指南指出,虽然四环素类药物可能对腹腔感染有效,但MIC与临床结果没有相关性,因此未定义折点。读者还应注意,虽然有的药物有折点,但在某些情况下,两种标准之间的差异可能超过两个稀释浓度(例如,氨苄西林)。

EUCAST建议在厌氧条件下进行乳杆菌属的药敏试验,而CLSI具有乳杆菌特定的折点,建议在有氧条件下(含5%CO_2)培养的含溶解马血[2.5%至5%(体积分数)]的阳离子调节的Mueller-Hinton肉汤中对该菌属进行药敏试验[367]。对于其他厌氧菌(包括革兰阳性厌氧无芽胞杆菌),使用添加了氯化血红素、维生素K_1和绵羊血[5%(体积分数)]的布鲁菌琼脂,利用琼脂稀释法来定义CLSI的MIC折点。微量肉汤稀释法仅适用于脆弱拟杆菌群。相比之下,EUCAST不推荐特定的MIC方法,只说明在使用商品化的MIC方法时应遵循制造商的建议。实际上,琼脂稀释法在技术上具有挑战性,因此,许多实验室改为使用梯度扩散条(例如Etest或Liofilchem)。梯度扩散法对厌氧菌的检测是可靠的,98%待测菌的MIC在参考方法的两倍稀释度之内,且存在≤2%的极重要/重要误差[368]。然而,已经报道了甲硝唑假耐药与培养基和培养条件有关[369]。

由于上述原因,某些厌氧菌的抗菌药物敏感性通常可以根据细菌的鉴定来推断,药敏试验可以送参考实验室,如果在实验室内进行,则需要孵育长达48 h。由于细菌分类学的变化,有关革兰阳性无芽胞厌氧杆菌的抗菌药物敏感性的既往结果可能难以解释或变得复杂[370]。还应考虑到,商品化鉴定系统的鉴定准确性问题存在一定挑战。

甲硝唑通常用于许多厌氧菌感染的经验性治疗和目标治疗。如上所述,有些菌属可能在有氧条件下能够生长并对甲硝唑天然耐药。皮肤杆菌属、丙酸杆菌属、*Actinotignum*、放线棒菌属和放线菌属的一些细菌对甲硝唑天然耐药[371-373]。阴道陌生菌和柯氏动弯杆菌对甲硝唑的耐药率很高,而羞怯动弯杆菌,以及埃格菌属和真杆菌属细菌对甲硝唑的耐药率各不相同[127]。目前尚不清楚是否由于阴道陌生菌或柯氏动弯杆菌对甲硝唑的耐药性导致了BV患者治疗失败[187]。对万古霉素敏感是革兰阳性菌的一个普遍特征。但是,对万古霉素和其他糖肽类耐药在乳杆菌属细菌很常见(见下文)。解黄酮菌属细菌对万古霉素的敏感性降低(MIC 4～8 μg/ml)[61]。在微小陌生菌的一些菌株中已经检测到*vanB*基因[196]。

普遍认为放线菌属对青霉素敏感,并且对其他β-内酰胺的MIC通常很低。对克林霉素的敏感性不定,17%～33%的菌株耐药[374-375]。大多数关于*Actinotignum*和放线棒菌属细菌的敏感性数据来源于斯氏放线菌,该菌β-内酰胺类和万古霉素的MIC较低[117,371],但由于存在*ermX*基因而使红霉素和克林霉素的MIC不定[376]。然而,环丙沙星和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(SXT)的MIC较高,尽管左氧氟沙星的MIC在这些菌株中可能处于敏感范围。动弯杆菌属细菌对青霉素、克林霉素和万古霉素敏感。与放线菌属一样,皮肤杆菌属细菌普遍对青霉素敏感,但对克林霉素的敏感性不定。最近的一项研究表明,皮肤杆菌属对氟喹诺酮类药物的耐药性(*gyrA*)在体外很容易被筛选出来,其临床意义尚不清楚[377]。嗜淋巴丙酸微菌除了对甲硝唑天然耐药外,对左氧氟沙星和SXT的MIC较高,但对β-内酰胺类抗生素的MIC较低[164-165]。

双歧杆菌对环丙沙星的耐药率较高,对甲硝唑的敏感性不定(耐药率20%)[170]。尽管大多数分离株的克林霉素、万古霉素和许多β-内酰胺类的MIC均较低,但一项研究发现,>40%的菌株对青霉素耐药,对头孢西丁的敏感性存在差异[374]。异斯卡多维菌对β-内酰胺类、糖肽类、四环素类、SXT和利奈唑胺的MIC较低。由于23S rRNA的点突变,在一个菌株中观察到红霉素和克林霉素MIC值非常高(≥256 μg/ml),同时还观察到与*parC*突变相关的氟喹诺酮获得性耐药[378]。尽管埃格菌属细菌对甲硝唑敏感,但对青

霉素和头孢曲松耐药率高，对哌拉西林/他唑巴坦、克林霉素和莫西沙星的敏感性不同[204]。

尽管万古霉素和替考拉宁对大多数革兰阳性细菌有活性，但乳杆菌属细菌对糖肽类的耐药却很常见。据报道，在80例乳杆菌感染的分离株中，不到1/4对万古霉素敏感[218]。对于乳杆菌属细菌，其抗菌谱可分为几种类型，其中两种为万古霉素耐药型，两种为万古霉素敏感型[379]。发酵乳杆菌，唾液乳杆菌和阴道乳杆菌均对万古霉素耐药，而干酪乳杆菌-类干酪乳杆菌(*L. paracasei*)和鼠李糖乳杆菌对万古霉素耐药，对头孢西丁、头孢曲松和厄他培南的MIC升高。加氏乳杆菌-约翰逊乳杆菌群和詹氏乳杆菌通常对万古霉素敏感，但对氟喹诺酮类药物和达托霉素的MIC升高[220,226,379]。嗜酸乳杆菌、卷曲乳杆菌、惰性乳杆菌、德氏乳杆菌和其他不常见的乳杆菌均对万古霉素敏感，但对利奈唑胺耐药[379]。通常，乳杆菌属对青霉素和氨苄西林敏感，但对头孢呋辛和头孢曲松等头孢菌素的MIC范围很大[220,226,379]。红霉素、克林霉素和亚胺培南通常敏感，但偶尔会检测出耐药菌株[380]。

在革兰阳性无芽胞厌氧杆菌中，达托霉素的MIC差异很大。龋齿放线菌MIC_{90}>32 μg/ml，许多其他放线菌(如麦尔放线菌)的MIC_{90}则为8 μg/ml[381]。但是，在没有钙的情况下进行达托霉素敏感性试验时，许多MIC升高。有钙存在时，双歧杆菌属和丙酸杆菌属(皮肤杆菌属)的达托霉素MIC_{90}较低(分别为0.5和2.0 μg/ml)，而对于放线菌属和迟缓真杆菌的达托霉素MIC_{90}继续升高(分别为4和16 μg/ml)[382]。替拉凡星对放线菌属、真杆菌属和丙酸杆菌属(皮肤杆菌属)细菌具有很高的活性，MIC_{90}<0.25 μg/ml，而干酪乳杆菌对替拉凡星天然耐药[381]。相关糖肽类药物达巴凡星对放线菌属、真杆菌属和丙酸杆菌属的MIC_{90}较低，尽管在一项研究中检测的乳杆菌的MIC_{90}较高(>32 μg/ml)[382]。对于放线菌属和乳杆菌属细菌，观察到了达巴凡星不同的MIC_{90}。放线菌属细菌克拉霉素的MIC_{90}较低，乳杆菌属细菌MIC_{90}各不相同，而真杆菌属细菌的克拉霉素耐药性较高[383]。

一份报道发现，斯莱克菌属细菌对甲硝唑耐药并不常见，尽管所有检测菌株都对SXT耐药[209]。然而也有报道指出，小斯莱克菌对甲硝唑耐药[210,212]。相比之下，香港触酶杆菌(*C. hongkongensis*)对甲硝唑敏感，但对头孢噻肟耐药，青霉素的MIC不定[243]。一项研究表明，莫氏细小杆菌通常对SXT耐药[277]。

在标准布氏肉汤中进行药敏试验时，*E. tayi*生长不好。迄今检测的3株*E. tayi*分离株对甲硝唑、青霉素、氨苄西林、哌拉西林、美洛西林、氨苄西林/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦、头孢替坦、头孢西丁、亚胺培南、美洛培南、克林霉素和氯霉素敏感，其中1株四环素的MIC在中介范围[41]。对于毛绒厌氧杆菌(*Lachnoanaerobaculum*)，仅有标准菌株的药敏数据，青霉素G在敏感范围内(MIC≤0.5 μg/ml)[36]。到目前为止检测的有限数量的皮奥里亚鲁滨逊菌对青霉素耐药，对克林霉素的敏感性不定，对哌拉西林/他唑巴坦、阿莫西林/克拉维酸、美罗培南、厄他培南和甲硝唑敏感，头孢硝噻吩纸片法β-内酰胺酶试验呈阴性[255-257]。

在1例卫星沙特尔沃思菌感染的病例中，分离株对青霉素、克林霉素、甲硝唑、氨苄西林、头孢曲松、哌拉西林/他唑巴坦和厄他培南的MIC均≤0.5 μg/ml[253]。总之，读者应意识到不常见细菌缺乏足够的数据。对于许多菌种，数据仅限于少数几个菌株，缺乏临床结果相关性。一般来说，虽然革兰阳性无芽胞厌氧杆菌通常对青霉素和其他β-内酰胺类的敏感性很高，但不应认为这类药物具有普遍敏感性[374,384-386]。

九、结果的评价、解释和报告

革兰阳性无芽胞厌氧杆菌感染通常是混合感染。从无菌部位分离这些细菌具有重要的临床意义，但在多种细菌感染的情况下，对其中某一种细菌临床意义的解释可能比较困难。由于许多感染都靠近皮肤黏膜表面，因此应在是否存在共生菌污染的情况下解释结果。同样，直接革兰染色结果可以用来指导后续工作流程。重要的是，IDSA指南建议不需要对混合感染中分离出的每种细菌进行鉴定和药敏试验。相反，指南建议对培养结果进行一般描述(如混合需氧和厌氧肠道菌群)，并对已知存在耐药性的某些细菌进行选择性鉴定[279]。此外，这些指南还规定，应对具有临床意义的分离株进行药敏试验，而不是对培养物中分

离的所有细菌进行药敏试验。但是,实验室还应该意识到,在混合感染中有些细菌不能忽视:放线菌属细菌通常与其他细菌共存,应该告知安排治疗的医生。

疑似感染部位采集的脓液标本需要观察硫黄颗粒是否存在,并进一步镜检分析颗粒中的微生物菌群。如果硫黄颗粒存在,可作为临床确诊放线菌病的依据。如果在疑似污染标本中分离到纯培养的放线菌或相关菌属细菌,结果解释应谨慎。尤其是当头颈部标本出现类似情况时更要注意,因为放线菌是口腔正常菌群的绝对优势菌。

实验室进行厌氧培养应确保足够的培养时间。由于体内和体外的生长速度相差很大,最少要培养 7 天才能给出最终报告,过早报告那些生长速度快的菌株,而漏报生长缓慢的厌氧菌会导致漏诊和误诊。对于 PJI 及脑室-腹膜分流感染,一些研究表明,孵育 14 天是分离皮肤杆菌属细菌的最佳条件。

MALDI-TOF MS 数据库在鉴定无芽胞厌氧杆菌方面的不断改进,会进一步加深我们对这类细菌与潜在疾病关系的理解。此外,提高鉴定的准确性,最终也将有助于更好地描述革兰阳性无芽胞厌氧杆菌中不常见菌的抗菌药物敏感性。即便如此,实验室人员和临床医生还应该意识到这类细菌在鉴定和药物敏感性方面仍存在一些问题及结果解释上的特有的困难,从而优化相关感染的临床管理。

参考文献请扫二维码查阅

第55章 梭菌属和拟梭菌属*

ED KUIJPER，FRÉDÉRIC BARBUT

（金大智 译；姚开虎、苏建荣 审校）

一、分类

梭菌属（*Clostridium*）由专性厌氧（或偶为微需氧）的革兰阳性杆菌组成，广泛存在于土壤、水、昆虫和动物及人类的胃肠道。梭菌属现有的细菌种和亚种已超过240种，但在梭菌属的分类学上尚未达成共识（http://www.dsmz.de 或 http://www.bacterio.net/）。与人感染相关、有临床意义的梭菌数量十分有限（表55-1）。

从系统发生学上看，梭菌属十分多样化，有很多种梭菌与其他产芽胞或不产芽胞细菌属混杂。习惯上依据形态学、超微结构和生理特征对种进行划分。在过去的20年中，基于16S rRNA基因序列的分析表明，"梭菌"（clostridia）可分成19个基因簇（clusters）[1]。群Ⅰ组成了梭菌属的基础，并且与Johnson与Francis在40年前提出的组（group）Ⅰ类似[2]。模式种丁酸梭菌（*Clostridium butyricum*）及大多数临床相关梭菌种聚集在rRNA同源性的组Ⅰ中（文献[3]已作综述）。Lawson和Rainey提议将梭菌属限定为丁酸梭菌及其相关菌种[4]。艰难梭菌（*Clostridium difficile*）所在rRNA簇Ⅺ，与严格意义梭菌属rRNA簇Ⅰ的遗传距离较远，故根据表型、化学分类和系统进化分析，簇Ⅺ被提议为拟梭菌属（*Clostridioides*）新属，当前的命名即艰难拟梭菌（*Clostridioides difficile*），但在目前阶段，使用艰难梭菌的名字也可以接受[5]。（译者注，本节均使用原来的旧名称：艰难梭菌）

从人类粪便中分离得到的哈氏梭菌（*C. hathewayi*）[6]和鲍尔特梭菌（*C. bolteae*）[7]，是两种归类到球形梭菌（*C. coccoides*）rRNA组的新型梭菌。从表型上看，梭形梭菌（*C. clostridioforme*）是一种相对多样化的厌氧菌。通过对107株来自多家临床实验室、表型上鉴定为梭形梭菌的菌株进行16S rRNA基因序列分析后，发现这些菌株实际上可分成3种梭菌：鲍尔特梭菌、梭形梭菌和哈氏梭菌[8]。巴特利特梭菌（*C. bartlettii*）是另一种从人粪便中分离得到的新梭菌种[9]，临床意义不明。新生儿梭菌（*C. neonatale*）是从坏死性小肠结肠炎（Necrotizing enterocolitis，NEC）菌血症患者分离得到的又一新菌种[10]。人结肠厌氧棍状菌（*Anaerotruncus colihominis*）是从人粪便中分离得到[9]并归属到柔嫩梭菌rRNA集群中的一种新型梭菌，随后在菌血症患者体内也被分离得到[11]。基于生化特性、系统分类地位、DNA中G+C含量及DNA-DNA杂交，建议将环切梭菌（*Clostridium orbiscindens*）和普劳特真杆菌（*Eubacterium plautii*）合并成为新种——普劳特解黄酮菌（*Flavonifractor plautii*）[12]。

二、梭菌属简介

梭菌属（*Clostridia*）属于厚壁菌门（phylum Firmicutes），由各种各样的（复系的）群（group）组成，至少包括12个进化谱系（lineages）。梭菌的G+C含量从22 mol%至55 mol%不等，产毒素梭菌的G+C含量波动范围明显更窄，24～29 mol%[3]。习惯上用于鉴定梭菌的形态学和表型特征包括：①形成芽胞；②厌氧能量代谢方式；③不

*本章包含Dennis L. Stevens、Amy E. Bryant和Karen Carroll在本手册第11版第53章中呈现的部分内容

表 55-1 具有临床意义的梭菌的特征[a]

菌种	水解明胶	卵磷脂酶	脂肪酶	吲哚	水解七叶苷	硝酸盐还原	牛奶消化	发酵作用 葡萄糖	阿拉伯糖	纤维二糖	果糖	乳糖	麦芽糖	甘露醇	甘露糖	蜜二糖	核糖	水杨苷	蔗糖	木糖	芽孢在菌体位置	PYG 代谢终产物
能够分解糖，并水解蛋白质																						
双酶梭菌[b]（*C. bifermentans*）	+	+	−	+	$+^{-}$	−	+	+	−	−	$-^{w}$	−	W^{-}	−	$-^{w}$	−	−	−	−	−	ST	A (iv, ic, p, ib, b, l, s)
肉毒梭菌[c]（*C. botulinum*）																						
A、B、F 型	+	−	+	−	+	−	+	$+^{-}$	−	−	$-^{w}$	−	$-^{w}$	−	−	−	−	−	−	−	ST	A, B, IV, ib (ic, v, p)
B、E、F 型[d]	+	−	+	−	−	−	−	+	W^{-}	−	$+^{w}$	−	$+^{-}$	$-^{w}$	$+^{w}$	$-^{w}$	v	−	$+^{w}$	−	ST	B, A (l)
C、D 型	+	$-^{+}$	+	$-^{+}$	−	−	+	+	−	−	V	−	V	−	V	$-^{w}$	V	−	−	−	T	B, P, A (v, l, s)
尸毒梭菌（*C. cadaveris*）	+	−	−	+	−	−	+	+	−	−	V	−	−	−	$-^{w}$	−	−	−	−	−	T	B, A
艰难梭菌[e]（*C. difficile*）	+	−	−	−	+	−	−	$+^{w}$	−	V	$+^{w}$	−	−	W^{+}	V	−	$-^{w}$	$-^{w}$	−	$-^{w}$	ST[t]	B, A, ic, iv, ib (v, l)
诺氏梭菌 A 型（*C. novyi* A）	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−	$-^{w}$	−	V	−	−	$-^{w}$	V	$-^{w}$	−	−	ST	A, B, P
产气荚膜梭菌（*C. perfringens*）	+	+	−	−	V	V	+	+	−	$-^{+}$	+	+	+	−	+	V	V	$-^{+}$	+	−	ST	A, B, L (p, s)
腐败梭菌（*C. putrificum*）	+	−	−	−	$-^{+}$	−	+	$+^{w}$	−	−	$-^{w}$	−	$-^{w}$	−	−	−	−	−	−	−	T[ST]	A, B, ib, iv (p, ic, v, l, s)
败毒梭菌[f]（*C. septicum*）	+	−	−	−	+	V	+	+	−	$+^{w}$	+	+	+	−	+	−	V	V	−	−	ST	B, A (p, l)
索氏梭菌[b]（*C. sordellii*）	+	+	−	+	$-^{+}$	−	+	+	−	−	V	−	W	−	$-^{w}$	−	$-^{w}$	−	−	−	ST	A (IC, p, ib, iv, l)
产胞梭菌[f]（*C. sporogenes*）	+	−	+	−	+	−	+	+	−	$-^{w}$	−	−	$-^{w}$	−	−	−	−	−	−	−	ST	A, B, iv, ib (p, ic, v, l, s)
能够分解糖，不能水解蛋白质																						
巴拉特梭菌（*C. baratii*）	−	+	−	−	+	$+^{-}$	−	+	−	+	+	W^{+}	W^{+}	−	+	$-^{w}$	W^{-}	$+^{-}$	+	−	ST	B, A, L (p, s)
鲍尔特梭菌[g]（*C. bolteae*）	−	−	−	−	$-^{+}$	−	−	+	+	$-^{+}$	+	−	+	−	+		−	$-^{+}$	+	+	ST	A (l)
丁酸梭菌（*C. butyricum*）	−	−	−	−	+	−	−	+	$+^{-}$	+	+	+	+	$-^{w}$	+	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	+	+	ST	B, A (l, s)
肉梭菌[h]（*C. carnis*）	−	−	−	−	+	−	−	+	−	W^{+}	v	v	w+	−	w+	−	−	w	w+	−	ST	B, A, L (s)
梭形梭菌[g]（*C. clostridioforme*）	−	−	−	−	+	−	−	+	+	+	+w	+	+	−	+	v	v	+	+w	+w	ST	A (l)
乙二醇梭菌（*C. glycolicum*）	−	−	−	−	$-^{+}$	−	−	+	−	−	+w	−	v	−	−	−	−	−	−	+−	ST	A, IV, IB (p, l, s)
哈氏梭菌[g]（*C. hathewayi*）	−	−	−	−	$+^{w}$	−	−	+	V	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	ST	A (l)

(续 表)

菌种	水解明胶	卵磷脂酶	脂肪酶	吲哚	水解七叶苷	硝酸盐还原	牛奶消化	发酵作用 葡萄糖	阿拉伯糖	纤维二糖	果糖	乳糖	麦芽糖	甘露醇	甘露糖	蜜二糖	核糖	水杨苷	蔗糖	木糖	芽孢在菌体位置	PYG代谢终产物
吲哚梭菌(*C. indolis*)	−	−	−	+	+	$+^{-}$	−	+	W^{-}	$+^{w}$	w+	w+	w+	−w	−w	−w	−w	w−	v	v	T	A
无害梭菌[e](*C. innocuum*)	−	−	−	−	+	−	−	+	$-^{+}$	+	+	−w	−	+w	+	−	v	+w	+w	−w	T	B, L, a (s)
类腐败梭菌(*C. paraputrificum*)	$-^{w}$	−	−	−	+	$-^{+}$	−	+	−	+	+w	+	+	−	+	−	w−	+	+	−	TST	B, A, L (s)
多枝梭菌(*C. ramosum*)	−	−	−	−	+	−	−	+	−	+	+	+	+	+−	+	+−	v	+	+	−w	T	A, l (s)
楔形梭菌(*C. sphnoides*)	−	−	−	+	+	$+^{-}$	−	+	$-^{w}$	$+^{w}$	+w	w+	+w	w+	+w	v	−w	v	w−	v	STt	A (l, s)
共生梭菌(*C. symbiosum*)	$-^{w}$	−	−	−	−	−	−	$+^{w}$	V	−	+	−+	−	−	v	−	−	−	−	−	ST	A, B, L
第三梭菌[h](*C. tertium*)	−	−	−	−	+	$+^{-}$	−	+	−	$+^{w}$	+	+	+	w+	+w	+w	+w	+w	+	v	T	A, B, L
不能水解糖																						
阿根廷梭菌(*C. argentinense*)	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	ST	A, b, ib, iv (l)
矛形梭菌(*C. hastiforme*)	+	−	−	−	−	$-^{+}$	$-^{+}$	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	T	A, B, iv, ib (p, ic)
溶组织梭菌[h](*C. histolyticum*)	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	ST	A (l, s)
泥渣梭菌(*C. limosum*)	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	ST	A (l, s)
近端梭菌(*C. subterminale*)	+	$-^{+}$	−	−	$-^{+}$	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	ST	A, B, IV, ib (p, ic, l, s)
破伤风梭菌[f](*C. tetani*)	+	−	$-^{w}$	V	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	T	A, B, p (l, s)

注：[a]+. 阳性；−. 阴性；v. 反应多样；w. 弱阳性；ST. 次端；T. 末端。上标表示罕见变异。黑体字表示主要反应结果。大写字母表示主要的蛋白胨-酵母粉-葡萄糖(PYG)代谢产物，小写字母表示次要产物，括号表示如下脂肪酸可变反应：A. 乙酸；B. 丁酸；IB. 异丁酸；IC. 异己酸；IV. 异戊酸；L. 乳酸；P. 丙酸；PA. 苯乙酸；S. 琥珀酸；V. 戊酸。[b]双酶梭菌脲酶阴性，在蛋黄琼脂平板上通常形成粉白色菌落，索氏梭菌脲酶阳性。[c]需要进行毒素中和试验。将疑似肉毒梭菌菌株或标本移送当地或州立公共卫生部门。[d]不分解蛋白质。[e]L-吡咯氨酸氨基肽酶可区别艰难梭菌和无害梭菌，前者阳性，后者阴性。[f]成群(swarming)。[g]雪茄样，鲍尔特梭菌乳糖和β-NAG阴性；梭形梭菌乳糖阳性，β-NAG阴性，哈氏梭菌乳糖和β-NAG阳性。[h]第三梭菌、肉梭菌和多数溶组织梭菌需氧生长

能够将硫酸盐降解成硫化物；④革兰阳性细胞壁结构。

梭菌属的营养细胞形态具有多形性，杆状，成对排列或呈短链状；胞体圆形或尖形末端[13-14]。耳蜗形梭菌（*C. cocleatum*）和螺状梭菌（*C. spiroforme*）的菌体之间能够形成紧密的线圈或螺旋结构。梭菌在生长初期多呈革兰染色阳性，而有些梭菌呈阴性，如梭形梭菌、哈氏梭菌、无害梭菌（*C. innocuum*）和多枝梭菌（*C. ramosum*）。有些梭菌[如破伤风梭菌（*C. tetani*）]在形成芽胞时呈革兰染色阴性。芽胞通常比营养细胞更宽，使梭菌呈现纺锤形。大多数梭菌能够通过周生鞭毛运动。无动力梭菌包括产气荚膜梭菌（*C. perfringens*）、多枝梭菌和无害梭菌[13]。

梭菌代谢方式各异。目前认为[1]，大多数梭菌是有机化能营养型，有些梭菌可能是有机化能自养型或无机化能营养型。它们能分解糖，或水解蛋白质，也可两者都能，或都不能；无法进行异化硫酸盐还原作用；通常能够以碳水化合物、蛋白质和多肽、嘌呤、嘧啶作为底物产生有机酸与醇的混合物。

大多数梭菌专性厌氧，对氧的耐受性各异。有些梭菌[如第三梭菌（*C. tertium*）]在有氧环境下能够生长，但不产芽胞；一些耐氧梭菌，如肉梭菌（*C. carnis*）、溶组织梭菌（*C. histolyticum*）及某些产气荚膜梭菌菌株，在5%～10% CO_2 条件下固体培养基上可以生长。耐氧梭菌和某些芽胞杆菌可以通过以下方法进行鉴别：①梭菌通常只在厌氧环境下产生芽胞；②梭菌在厌氧环境中比在空气中生长更好；③梭菌通常不产触酶；④梭菌有饱和或单一不饱和的直链细胞脂肪酸（cellular fatty acid，CFA）组分，而芽胞杆菌属含有支链细胞脂肪酸组分。虽然梭菌通常呈触酶与超氧化物歧化酶阴性，但有些菌株，如产气荚膜梭菌可检测出痕量的上述酶。此外，梭菌缺乏细胞色素系统，并因此呈氧化酶阴性。梭菌在自然界和感染中常见，与各种细菌混合在一起，因需氧和兼性厌氧菌消耗氧气，提供了营养和其他因素，为梭菌生长营造了适宜环境。

在所有细菌中，梭菌产生毒素的数量最多。有趣的是，一些毒素是有益的药理学和生物学工具。大部分梭菌毒素是成孔毒素，可导致坏疽和胃肠道疾病。三种类型的梭菌毒素具有进入细胞的能力：大梭菌糖基化毒素，二元毒素和神经毒素（文献[15]中已作综述）。梭菌属群Ⅰ中至少15种梭菌产生蛋白毒素，运用传统分离技术与基因组分析方法已发现多种新的毒素和毒性蛋白[16]，其中包括神经毒素、肠毒素、细胞毒素、胶原酶、通透酶、坏死毒素、脂肪酶、卵磷脂酶、溶血素、蛋白酶、透明质酸酶、DNA酶、ADP核糖转移酶、神经氨酸酶及其他一些仅知道是致死性毒素的蛋白。肉毒杆菌神经毒素（BoNT）和破伤风神经毒素（TeNT）是已知毒性最大的毒素，对各种动物（包括人类）致死剂量为每千克体重0.2～10 ng[16]。ε毒素是一种由产气荚膜梭菌B和D型菌株产生的33 kDa蛋白质，能够造成动物大脑、心脏、脊髓和肾的水肿与出血。ε毒素是梭菌毒素中最为致命的毒素之一，是一种潜在的生物恐怖制剂[16]。一些致病性梭菌，如肉毒梭菌（*C. botulinum*），艰难梭菌，梭状芽胞杆菌，产气荚膜梭菌和螺状梭菌，利用二元蛋白质机制造成肠中毒。这些二元蛋白质构成了ADP-核糖基转移酶和细胞结合成分通过受体介导的内吞作用造成细胞中毒[17]。

多种致病梭菌的基因组序列已被组装和注释，以便于人们更为深入地了解梭菌致病相关毒力因子：

产气荚膜梭菌（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/158）

艰难梭菌（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/535）

肉毒梭菌（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/726）

破伤风梭菌（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1098）

三、流行病学与传播

梭菌属因能够产生抗性芽胞而在自然界广泛存在。常见于土壤、粪便、污水及海洋沉积物。产气荚膜梭菌在土壤中的分布明显受畜牧业规模和持续时间的影响，含有产气荚膜梭菌的土壤污染战伤创面会引起气性坏疽。研究显示，梭菌性气性坏疽在欧洲农业用地周围的发病率比非洲撒哈拉地区要高。同理，破伤风和食源性肉毒中毒的发病率与土壤、水和多种食物中梭菌芽胞的存在密切相关。医院获得性肠道艰难梭菌感染

(*C. difficile* infection, CDI)的暴发大多可追踪到环境来源和其他典型的院感背景因素，尽管已有研究提示无症状携带者也可发挥作用。梭菌在人和动物肠道、女性生殖道及口腔黏膜的正常菌群中大量存在。

四、临床意义

破伤风、食源性肉毒中毒、气性坏疽等外源性梭菌感染或中毒已经横行了几个世纪，近年来新出现了医院和社区获得性艰难梭菌结肠炎。内源性梭菌联合不产芽胞厌氧菌及兼性或需氧菌，也可致糖尿病患者和肠道或呼吸道黏膜完整性受损患者的严重感染。头颈部感染、脑脓肿、鼻窦炎、耳炎、吸入性肺炎、肺脓肿、脓胸、胆囊炎、腹腔内感染、妇产科感染、软组织感染、肌坏死和化脓性关节炎都可能与梭菌相关。常见诱因有外科手术、创伤、血管瘀伤、肠梗阻、恶性肿瘤、免疫抑制药、糖尿病、需氧菌感染，以及使用对梭菌低活性的抗菌药物(详见下文艰难梭菌感染部分)等。

(一)梭菌菌血症

梭菌是血流感染的重要病原[18-19]。由梭菌引起的威胁生命的软组织感染，具有暴发性、独特的临床表现、复杂的管理问题。梭菌属的产气荚膜梭菌、败毒梭菌和溶组织梭菌是造成创伤性气性坏疽的主要原因，在战争、飓风、地震和其他大规模伤亡情况下，其发生率剧增[20]。与此相反，成人和儿童中又都有非创伤性或自发性梭菌致死的病例报道。梭菌属通常来源于胃肠道，其中最常见的梭菌是产气荚膜梭菌和败毒梭菌[21]。当败毒梭菌为感染的病原体时，病死率较高。败毒梭菌在健康人群的粪便标本中鲜少检出，但能够在正常人的阑尾中检出。败毒梭菌与胃肠道异常和中性粒细胞减少的自发性气性坏疽有关[14,21]。超过50%的败毒梭菌血培养阳性的患者有肠道异常，如肠憩室病，或结肠癌等潜在恶性肿瘤。另一个临床上的重要联系是败毒梭菌菌血症与不同原因的中性粒细胞减少症[22]，尤其与累及末端回肠或盲肠的粒细胞减少性小肠结肠炎的联系更具特异性[14,20]。糖尿病、严重心血管动脉粥样硬化、厌氧性肌坏死(气性坏疽)患者也可能发生败毒梭菌菌血症[22]。及时确诊败毒梭菌菌血症并给予适当治疗的临床重要性无论如何强调都不为过。败毒梭菌菌血症患者通常危在旦夕，并且有向远端解剖部位转移扩散的可能，可导致自发性肌坏死[14]，病死率很高。有菌血症的肝硬化患者体内也能分离到败毒梭菌、产气荚膜梭菌、双酶梭菌(*C. bifermentans*)和其他梭菌[23]。部分患者证实存在感染性休克[20]。

另一种对存在严重基础疾病患者，如恶性肿瘤、急性胰腺炎等，有重要意义的梭菌是第三梭菌[24]。有或没有中性粒细胞减少性小肠结肠炎的患者血液中都可查到这种细菌，也可查到败毒梭菌(*C. septicum*)、产气荚膜梭菌[24]。第三梭菌的鉴别与治疗中可能遇到特殊情况。这种细菌可能呈革兰阴性，并且耐氧，对甲硝唑、克林霉素、头孢菌素耐药。索氏梭菌(*C. sordellii*)和产气荚膜梭菌与中毒性休克综合征及流产有关[25-26]。

Woo 等[27]和 Simmon 等[18]关于厌氧性菌血症的研究指出，对编码 16S rRNA 基因序列进行测序能够鉴定梭菌。产气荚膜梭菌和第三梭菌是造成菌血症最常见的梭菌，检出率分别为 79% 和 5%。临床相关的梭菌菌血症病死率为 29%～35%，死亡危险因素[28]包括肝病与高龄。梭状梭菌群(包括梭形梭菌、哈氏梭菌和鲍尔特梭菌)也能够引起菌血症[8,29]。

(二)肠道感染

1. 食物中毒 产气荚膜梭菌是美国、加拿大和欧洲食源性疾病中最常见的病原菌之一[30-31]，均为 A 型菌株[30,32]。美国疾病预防控制中心(CDC)每年报道 16～31 起，未随时间有明显变化趋势，进行烹饪的餐馆是最常见的场所[31]。A 型产气荚膜梭菌所致食源性疾病，通常因摄入未恰当处理的肉或肉制品，如烹煮后缓慢降温或再加热不充分的肉汤。在初次烹煮过程中幸存的产气荚膜梭菌芽胞萌发，其繁殖体在缓慢冷却或不充分的再加热过程中增殖。当人进食大约 10^8 个或更有活性的产气荚膜梭菌繁殖体污染的食物时，病原菌在小肠碱性环境中形成芽胞，并在此过程中产生肠毒素[产气荚膜梭菌肠毒素(*C. perfringens* enterotoxin, CPE)]，从而致病。摄入病原菌污染的食物 7～30 h 出现腹泻，一般来说病情平缓，并有自限性；但儿童、老年人和免疫功能不全

患者症状较重,偶致死亡[33]。产肠毒素产气荚膜梭菌是导致养老院和三级医疗机构中老年患者持续性腹泻的病原体,并在非假膜性肠炎型抗生素相关性腹泻(antibiotic-associated diarrhea,AAD)的发生中有重要作用。

引起食物中毒的产气荚膜梭菌能够产生CPE。非食源性疾病,如AAD和散发腹泻中分离得到的产气荚膜梭菌菌株在质粒上携带*cpe*[34-35],可以传递给其他菌株。已有报道由不产生CPE的产气荚膜梭菌菌株(该菌株可产生二元肠毒素[36]或新的未知的肠毒素[37])引起的偶发性食源性胃肠炎暴发。

2. 坏死性肠炎[enteritis neroticans(Pigbel and Darmbarand)]和坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis,NEC) 产α毒素和β毒素的产气荚膜梭菌能够引起坏死性肠炎。位于质粒上的β毒素基因[35]是主要的致病机制[38]。坏死性肠炎是一种引起空肠缺血性坏死甚至危及生命的感染性疾病,主要发生在发展中国家,发达国家很少见。针对β毒素的免疫减少了新几内亚岛肠坏死的发病率[39]。坏死性肠炎在美国、英国、德国等发达国家也有发生,尤其危害营养不良或患有糖尿病、酒精性肝病[40]、中性粒细胞减少症[41]的成人。

NEC是一种严重的胃肠疾病,能够感染新生儿重症监护室中的低出生体重(早产)婴儿。四十多年来,该病的病因和发病机制仍然是个谜[42]。确切的病理生理学机制尚未阐明,推测早产、配方奶粉的使用和肠道菌群的改变等因素可诱发未成熟肠道的炎症反应[43]。NEC和坏死性肠炎的病理学相似点包括肠细胞坏死的模式及炎症程度。两种疾病都可表现为肠道气囊肿。有趣的是,已经报道的NEC暴发呈季节性变化,表明有传染源的存在。流行病学数据表明,产气荚膜梭菌或其他产气微生物(如"新生儿梭菌",某些其他的梭菌或克雷伯菌属某些种)在NEC的发病机制中起到重要作用,但尚未鉴定出NEC的单一致病菌[10,22,44]。

(三)艰难梭菌感染

1. 艰难梭菌感染的流行状况 艰难梭菌(*C. difficile*)感染(CDI)也以抗生素相关疾病而为人熟知,特别是在2003年起源于加拿大魁北克省的氟喹诺酮耐药的核糖体027型艰难梭菌(*C. difficile* ribotype 027)菌株在全球传播之后,CDI已成为北美和欧洲最常见的医源性感染[45-46]。美国每年超过250 000例腹泻由艰难梭菌引起,造成每年超过十亿美元的损失[47]。欧洲疾病预防控制中心(ECDC)估计:2011年至2012年期间,医源性CDI总数为123 997例(95%置信区间,107 697~441 969)[48]。CDI被越来越多地认为是社区中存在的一种疾病。社区CDI患者与医院患者具有不同的风险特征,但是曾使用过抗生素仍然是最重要的危险因素[49-50]。

2. 致病性决定区在艰难梭菌感染中的作用 只有携带了含有艰难梭菌肠毒素TcdA和细胞毒素TcdB(分别为*tcdA*和*tcdB*基因)致病性决定区(pathogenicity locus,PaLoc)的艰难梭菌才能引起CDI。缺乏TcdA的艰难梭菌菌株也能引起CDI暴发,在亚洲国家和东欧尤为常见[52]。TcdA和TcdB都是细菌毒素,它们通过自身裂解将其毒素域运送到真核靶细胞的细胞质[53]。仓鼠建模实验表明,TcdB在病程中可能比TcdA更为重要,但是这些结果没有被其他研究组证实[54-55]。1987年以来,已知某些艰难梭菌菌株会产生第三种毒素——二元毒素(CDT),其基因位于PaLoc区外。CDT频繁地在严重CDI相关的艰难梭菌菌株中见到[56]。毒素在CDI致病机制中的作用详见文献[57]。

TcdA和TcdB,同索氏梭菌、产气荚膜梭菌、诺维梭菌(*C. novyi*)[58]的毒素一样,都属于大梭菌细胞毒素(large clostridial cytotoxin,LCC)家族。TcdA和TcdB的分子质量分别为308 kDa和270 kDa。LCC能够使Ras家族的小GTP结合信号蛋白糖基化,引起细胞骨架裂解,进而导致细胞凋亡[59]。TcdA和TcdB在细胞内都能够自动激活。与白喉毒素A型和B型的不同之处在于它们是单链毒素。

PaLoc上的两种辅助蛋白——TcdR和TcdC[54]是控制毒素表达的调控因子[60]。由于*tcdC*基因在地方性流行的高毒力株、核糖体分型027型/NAP1(North American pulsotype 1,即北美脉冲场凝胶电泳分型1型)株(在此称为核糖体分型027型分离株)中出现碱基缺失而受到诊断学的关注[61]。一些研究指出*tcdC*基因片段缺失的菌株能产生更多的毒素,引起更严重的CDI[62-63],但还存在争议。

3. 艰难梭菌感染的危险因素与病程 仅获得艰难梭菌并不能引起CDI。其他几个危险因素是发生CDI的必要因素，包括年龄、住院治疗、严重的肠道外科手术、质子泵抑制剂治疗、因上述治疗引起的肠道定植抗性改变和产TcdA/TcdB艰难梭菌菌株定植等。

CDI的症状可从轻微的自限性腹泻到出血及黏液性腹泻（称为艰难梭菌相关性腹泻），再到完全的假膜性肠炎[64]。CDI可紧随抗生素治疗后立即发病，或抗生素治疗完成4～12周后发病[64]。在抗生素使用期间及抗生素使用后的第一个月内，发生CDI的风险最高[65]。与CDI相关的抗生素包括克林霉素、广谱头孢菌素和氟喹诺酮类药物[66-68]。

出血和黏液性粪便通常提示结肠黏膜存在严重损伤，可能导致更为严重的疾病。可以通过直肠镜检查及识别结肠黏膜上的假膜性肠炎进行临床诊断，尽管此诊断并非对CDI完全特异。严重病例一般出现在老年人、疗养院和免疫功能低下的患者[62-64]。

4. 艰难梭菌感染暴发流行和复发 高毒力株（如核糖体分型027型）在加拿大、美国、欧洲等全世界多个地区暴发流行过[45,51]。与其他艰难梭菌类型相比，这些病例的发病率和病死率更高。有证据表明使用氟喹诺酮类药物可能是这些暴发流行至关重要的触发因素[65,68]。

CDI尤其令人头痛的并发症是抗生素治疗之后复发，或由最初的致病菌株所致，或由另一种艰难梭菌菌株再感染引起[69]。CDI复发概率为20%～50%，取决于宿主的免疫力、微生物群的组成和感染菌株的类型，有些病例甚至在初次复发时就需要使用万古霉素或非达霉素进行治疗[70]。粪便移植在多种CDI的复发治疗中卓有成效[70-71]。有研究提出应用益生菌布拉糖酵母治疗CDI，结果尚不明确。从医院环境中根除艰难梭菌是阻止艰难梭菌芽胞扩散的重要措施，但一般消毒剂并不能杀灭芽胞。隔离有症状的患者是主要控制手段之一。然而近期研究显示，无症状携带者是艰难梭菌在社区和医院环境中的重要感染源[72-73]，可能有助于艰难梭菌传播[74]。

5. 抗生素相关性腹泻(AAD)的其他病因 艰难梭菌占AAD病因的比率≤20%[45,51]。无其他明显病因且艰难梭菌阴性的AAD患者粪便标本中曾分离到产肠毒素产气芽胞梭菌A型及产肠毒素较少的金黄色葡萄球菌[75]。尽管产气荚膜梭菌相关AAD的发生率为5%～20%[75]，但要准确判断产气荚膜梭菌在AAD中的作用还需更多流行病学研究。类似地，产毒素产酸克雷伯菌（*Klebsiella oxytoca*）也被认为是引起AAD的细菌，但其发生率可能非常低[76]。

(四)组织毒性梭菌的皮肤与软组织感染

产气荚膜梭菌、溶组织梭菌、腐败梭菌（*C. putrificum*）、诺维梭菌和索氏梭菌等有组织毒性的梭菌能够导致皮肤和软组织进行性的坏死性感染，部分归因于细菌蛋白酶、磷脂酶和细胞毒素[20]。坏死性梭菌软组织感染（气性坏疽）进展迅速，并以显著的组织破坏、产生气体、休克、常致死亡为特征[77]。

1. 梭菌性气性坏疽

(1)产气荚膜梭菌引起的外伤性气性坏疽：产气荚膜梭菌性肌坏死（气性坏疽）是人类和动物革兰阳性菌感染中最为严重的暴发性疾病之一。虽然人类气性坏疽发病率相对较低，但病死率普遍较高。诱发条件包括挤压性损伤、大中型动脉撕裂伤和被含有细菌芽胞泥土污染的长骨开放性骨折。在受到刀伤、枪伤等破坏肠道完整性的穿透伤之后，肠内容物渗漏到软组织中，引起腹壁及侧腹气性坏疽。有报道指出，在美国和北欧，吸毒人群因皮下注射“黑焦油海洛因”而感染产气荚膜梭菌、诺维梭菌A型和索氏梭菌，引起皮肤气性坏疽[20,78-79]。

梭菌性气性坏疽以感染部位突发剧烈疼痛和病变发展迅速、有血性浆液渗出、含气泡的恶臭伤口为特征。肌肉硬性水肿和硬化发展成为含有青白色至红褐色液体的皮肤水疱。病程后期该组织会液化、脱落。如果不进行合适的抗生素治疗，坏死组织的边缘通常以每小时几英寸的速度扩展[87]，根治切断术仍然是唯一可靠的救命治疗方法。气性坏疽通常伴随休克及器官衰竭，当病程发展至菌血症时，病死率超过50%。

产气荚膜梭菌所致外伤性气性坏疽的诊断并不难，因为①感染总是始于明显的创伤部位；②组织中有气体产生；③病程进展迅速。脓疱分泌液的革兰染色或组织活检检测的结果通常十分明确，能够观察到粗大的革兰染色阳性杆菌，无炎症

细胞。通过实验模型，Bryant 等[20,80]证明了产气荚膜梭菌气性坏疽的剧烈疼痛、迅速进展、组织显著破坏和中性粒细胞缺失都是由 α 毒素诱发的血小板和中性粒细胞介导的血管闭塞所致。

(2)败毒梭菌引起自发性非创伤气性坏疽：败毒梭菌引起的自发性非创伤气性坏疽的首发症状较模糊，随后出现突发剧烈疼痛和快速进展的组织破坏，组织中明显有气体[14,81]。肿胀加重，出现充满清澈、浑浊、出血性或略带紫色液体的大疱。周围皮肤呈紫色，反映出细菌毒素扩散进入周围组织引起的血管危象[14]。自发性气性坏疽患者的病死率从 67%到 100%不等，大多数患者在发病 24 h 内死亡。诱发因素包括结肠癌、憩室炎、胃肠道外科手术、白血病、淋巴增生性障碍、癌症化疗、放射治疗和 AIDS[14,20,81]。周期性、先天性或后天获得性的中性粒细胞减少症与败毒梭菌引起的自发性气性坏疽发病率的增加密切相关，这些患者中常出现 NEC、盲肠炎和远端回肠炎。这些胃肠道疾病有利于细菌入血，结果导致耐氧败毒梭菌在深部组织中增殖。败毒梭菌引起的菌血症或自发性气性坏疽幸存者需要进一步诊断检测以排除胃肠道病变。

2. 索氏梭菌引起的妇科感染 子宫气性坏疽，尤其是索氏梭菌所致者历史上多发生于非法或自行堕胎，在现代也可能由自然流产、正常分娩、剖腹产手术引起(文献[26]中已作综述)。索氏梭菌与米非司酮和米索前列醇药物流产亦有关联[26]。先前身体健康的年轻女性产后感染致命索氏梭菌会有独特的临床表现：基本没有发热和排脓现象，顽固性低血压，广泛的外周性水肿与渗出，血液浓缩，并有显著的白细胞增多[26]。这些病例死亡迅速，感染几乎百分百致死。

3. 其他梭菌性皮肤和软组织感染 捻发音蜂窝织炎，又称厌氧菌蜂窝织炎，多见于糖尿病患者，皮下组织或腹膜后组织出现典型症状，能够发展成暴发性的全身疾病，不累及肌肉和筋膜。

溶组织梭菌感染引起的蜂窝织炎会产生脓肿，另有报道因注射毒品而感染心内膜炎[82]。角膜移植手术缝线拆除后可能由索氏梭菌感染引起眼内炎[83]。穿透伤引起的产气荚膜梭菌性眼内炎属暴发性感染[84]。

4. 组织毒性梭菌的外毒素 第一次和第二次世界大战中，气性坏疽是战场伤害的主要并发症，对梭菌产生的致命毒素的现有认识大多来自于那时的研究。当时，研究者用希腊字母命名梭菌主要的致死毒素，其中字母"α"常用于命名最强或最有效的致死因子。在后来的几十年中，现代化技术的运用使人们对部分致死因子的作用机制有了更深的了解(文献[85]中已作综述)，在下文中会分部分介绍。

(1)产气荚膜梭菌主要的细胞外毒素：产气荚膜梭菌能产生 16 种以上的不同毒素，这些毒素能在人和动物体内引起组织毒性和肠道感染[86]。基于产气荚膜梭菌产生的 4 种类型的毒素：α(CPA)、β(CPB)、ε(ETX)和 iota(ITX)，可将其分离株分成 5 个毒素类型。这一分型系统非常有用，因为产气荚膜梭菌的不同毒素类型与某些疾病有关[86]。与气性坏疽有关的产气荚膜梭菌胞外毒素主要是染色体编码的 CPA 和产气荚膜溶血素 O(PFO)。另外，产气荚膜梭菌通过可移动基因元件编码的毒素引起肠道疾病，这些毒素包括产气荚膜梭菌肠毒素、坏死性肠炎毒素 B 样、ε 毒素和 β 毒素。α 毒素是一种致命的卵磷脂酶，具有磷脂酶 C 和鞘磷脂酶的活性。在小鼠模型针对产气荚膜梭菌 CPA 突变体和互补菌株的研究中，α 毒素被认为是主要的毒力因子[87]。使用等基因 PFO 突变体及其互补衍生物进行的类似研究表明，PFO 对疾病并非必不可少[88]。α 毒素负责毒素与细胞膜的结合，使其成为毒性反应必需的物质。此外，α 毒素能够在血管内激活血小板导致血小板聚集，形成闭塞性血栓，完全且不可逆地堵塞毛细血管、小静脉和小动脉[80]。如果没有充足的组织灌注，厌氧微环境范围不断扩大，活体组织快速破坏，产生特征性的梭菌性气性坏疽。

产气荚膜梭菌的 PFO 毒素(以前被称为产气荚膜梭菌 θ 毒素)是硫醇激活溶细胞素家族蛋白之一，该家族现命名为胆固醇结合溶细胞素，其他成员包括 A 型链球菌的链球菌溶血素 O、肺炎链球菌溶血素等。与宿主细胞膜上的胆固醇接触后，PFO 毒素单体寡聚体化并插入细胞膜中，形成孔洞并导致细胞裂解。调节这一活性的是一个 11 个氨基酸多肽的信号序列：ECTGLAWEWWR，它在胆固醇结合溶细胞素家族中高度保守[89]。PFO 毒素能够引起气性坏疽，可能是通过它能调节感染的炎症反应[90]。

(2)败毒梭菌主要的细胞外毒素：败毒梭菌主

要产生4种毒素：α毒素（具致死、溶血、坏死活性），β毒素（DNA酶），γ毒素（透明质酸酶）和δ毒素（腐败溶细胞素，一种遇氧分解的溶血素），还产生一种蛋白酶和一种神经氨酸酶。与产气荚膜梭菌的α毒素不同的是，败毒梭菌α毒素没有磷脂酶活性。对败毒梭菌野生型、突变型和互补型菌株的毒力试验发现，小鼠暴发性骨髓坏死的进展依赖于功能性穿孔溶血性α毒素的产生，α毒素引起心肌坏死并且抑制白细胞进入病灶[91]。

（3）索氏梭菌主要的细胞外毒素：经鉴定，索氏梭菌的致病菌株能够产生多达7种外毒素[92]。其中致死毒素（lethal toxin，LT）和出血毒素（hemorrhagic toxin，HT）是主要的毒力因子[92]。LT和HT都属于LCC蛋白家族，该蛋白家族分子质量均在250～308 kDa。其他成员包括艰难梭菌毒素A、毒素B和诺维梭菌的α毒素。LCC蛋白家族的所有成员都有特征性的氨基酸序列，一致性从26%至76%不等。LT和艰难梭菌毒素B的同源性最高，两者76%的氨基酸序列完全相同，同源性达到90%。LCC蛋白家族都具有糖基转移酶活性，能够修饰控制细胞周期、细胞凋亡、基因转录及肌动蛋白结构功能的信号分子，继而影响细胞形态、细胞迁移和细胞极性。一旦信号分子修饰完毕，LCC蛋白失活。肌动蛋白组装和组织细胞骨架的改变可能导致了大量特征性的索氏梭菌从毛细血管渗出。索氏梭菌神经氨酸酶能引起类白血病反应，部分原因是因为它能促进粒祖细胞的增殖[93]。其他外毒素有遇氧分解的溶血素、DNA酶、胶原酶、溶血卵磷脂酶等；但它们在发病机制中的作用还缺乏深入研究[92]。

（五）肉毒中毒

1. 病原菌和毒素　肉毒梭菌是肉毒中毒的原因，这个病罕见但动辄致命，以突发弛缓性麻痹为特征。肉毒梭菌的芽胞广泛分布于土壤和水生环境中。肉毒梭菌和丁酸梭菌、巴拉特梭菌（*C. baratii*）、阿根廷梭菌（*C. argentinense*）一样，能产生一种已知的最致命的毒素——BoNT。与人类肉毒杆菌中毒相反，动物肉毒杆菌中毒并不罕见，并且可以在野生动物和家畜中暴发流行[94]。BoNT有40多种不同的类型。BoNT主要由3个结构域组成，其中两个结构域可与神经末梢结合，并将毒素转运到神经元胞质；第三个结构域包含金属蛋白酶，可抑制周围神经末梢释放神经递质，导致典型的肉毒中毒症状，即松弛性麻痹和自主神经功能障碍[94-95]。BoNT有8种截然不同的血清型（A～H）[95-96]，能够作为临床和流行病学标志物[97]。可根据氨基酸序列的不同将毒素血清型分为多种亚型。肉毒梭菌毒素血清型A、B和E型是引起人类肉毒中毒的主因[98]。丁酸梭菌[99]和巴拉特梭菌[100]的神经毒素菌株分别能够产生E和F型神经毒素，主要引起婴幼儿肉毒中毒。16S rRNA基因测序证实存在产E型肉毒毒素的丁酸梭菌[101]。阿根廷梭菌从阿根廷的土壤中分离得到，能够产生G型神经毒素[98]。据报道，从五名突然死亡者的尸体解剖材料中分离得到阿根廷梭菌菌株，但未被证实，也没数据显示阿根廷梭菌与肉毒中毒有关。肉毒梭菌C型和D型主要和鸟及哺乳动物的肉毒中毒相关。已从环境、人类和动物肉毒中毒案例中分离得到能够产生一种以上血清型BoNT的肉毒梭菌菌株，通常其中一种血清型表达水平明显更高[98,100,102]。BoNT会和毒素基因簇中的无毒蛋白质共表达[103]，有证据显示，在胃肠道中共表达复合体比BoNT更为稳定。

非人为因素引起的肉毒中毒有4种类型：①经典型食源性肉毒中毒，由摄入受污染的含有肉毒梭菌毒素的食物引起。②创伤性肉毒中毒，肉毒梭菌在感染伤口中生长，继而产生肉毒毒素引起。③婴儿肉毒中毒，肉毒梭菌在婴幼儿胃肠道内定植并产生肉毒毒素引起。④其他类型：包括非常罕见的成人肠道毒血症[98]，类似于婴儿肉毒中毒，肉毒梭菌在成人的肠道定植并产生肉毒毒素引起；医源性肉毒中毒，出于美容的目的而注射过多的肉毒杆菌毒素；传播途径未知的肉毒中毒。2015年，美国CDC接到了199例实验室确认的肉毒中毒病例报告。其中食源性病例39例，婴儿肉毒中毒141例，创伤性肉毒中毒15例，病因不明4例。2014年，16个欧洲国家向ECDC报告了123例肉毒中毒病例，其中91例确诊病例。13个欧洲国家未报告任何病例。已经从艰难梭菌结肠炎患者[99]、肠道病毒感染患者[104]或克罗恩病患者[105]体内分离到肉毒梭菌。2008年，Sheth等[106]报道了一起由市售胡萝卜汁引起的国际范围肉毒中毒暴发事件。

无论肉毒中毒如何分类，肉毒毒素都是从外周部位（如肠、伤口或肺）进入血液，转移至运动神

经元的神经肌肉连接处，与突触前膜形成不可逆结合。所有血清型的 BoNT 作用部位都是运动神经元的突触前末梢[107-119]。据估算，BoNT 的静脉注射致死剂量为每千克体重 0.1～0.5 ng，同时也是口服给药最致命的蛋白毒素，口服致死剂量为每千克体重 0.2～1 μg[110]。对肉毒梭菌毒素和破伤风毒素三维立体结构的阐释有助于研究人员深刻了解它们的作用机制[108]。BoNT 通过受体介导的胞吞作用进入细胞膜，50 kDa 的轻链(催化结构域)通过一个蛋白质通道插入神经细胞[108-109]。一旦成功，BoNT 会特异性地裂解一些蛋白质，该蛋白质具有将含有神经递质的囊泡转运至细胞膜的功能[109]。神经末梢处的乙酰胆碱向神经肌肉接头的释放受到阻止，结果导致肌肉活动的神经支配受到阻滞[109]。肉毒中毒的临床标志是急性弛缓性麻痹，初期造成双侧脑神经损伤，累及眼、睑、头部、咽喉的肌肉，然后对称向下累及胸部和四肢肌肉。肉毒梭菌毒素和 TeNT 不同之处在于前者并不进入中枢神经系统(central nervous system，CNS)。非人为的食源性肉毒中毒时，胃肠道症状[如腹绞痛、恶心、呕吐、腹泻等(更多见便秘或顽固性便秘)]会出现在下行性弛缓性麻痹等神经症状之前。舌或咽部肌肉麻痹导致的上呼吸道堵塞，或膈肌与肋间肌麻痹，都可能引起呼吸衰竭，进而导致死亡[107,110]。一般来说，患者听力保持正常，不会丧失意识，能够感知疾病进程，因此十分痛苦。

2. 创伤性肉毒中毒 美国、英国、爱尔兰、德国、瑞士和挪威曾报道肉毒中毒与经皮注射墨西哥黑焦油海洛因到肌肉或皮肤(皮丘)之间的联系[111-113]。一项研究报道了 2000－2002 年英国和爱尔兰的 33 例创伤性肉毒中毒临床诊断病例[111]。其中 20 例病例的临床诊断经实验室检测确认，18 例由 A 型毒素引起，2 例由 B 型毒素引起。创伤性肉毒中毒也可由烫吸法吸食可卡因[114]、使用无证肉毒毒素制剂进行注射美容[115]或拔牙手术[116]引起。

3. 婴儿肉毒中毒 婴儿肉毒中毒是一种罕见的、潜在威胁生命的神经肌肉疾病，由 1 岁之前摄入肉毒梭菌芽胞引起[117]。婴儿肉毒中毒是美国最为常见的一种肉毒中毒，每年确认病例 70～100 例，至少另有 15 个国家报道过[117-119]。婴儿肉毒中毒病例毒素型的地理分布与各地土壤标本中肉毒梭菌毒素型芽胞的分布相同[117]。

大多数感染肉毒中毒的婴儿年龄在 3 周至 6 个月不等，已明确的危险因素包括暴露于土壤、灰尘和蜂蜜[117]。因为婴儿的肠道菌群还不成熟，所以容易被肉毒梭菌肠道定植。因此，生活在农村或农场环境中的婴儿感染肉毒杆菌的风险似乎高于生活在城市环境中的婴儿，可能是因为他们更容易接触粉尘颗粒[117]。除了蜂蜜之外，并没有在发病婴儿摄入的任何食物或液体中检测到肉毒梭菌芽胞，因此不建议给小于 1 岁的婴儿喂食蜂蜜。但是，大多数病例中，肉毒梭菌芽胞的确切来源从未被检出。不论来源如何，摄入的肉毒梭菌芽胞在肠道内开始生长，不断进行无性增殖，产生的神经毒素被吸收入血[98]。肉毒梭菌感染引起一系列的临床表现，从轻度肌张力低下到双侧脑神经麻痹、松弛性瘫痪及需要机械通气的膈肌无力等[117]。患病初期症状通常是便秘，容易被忽视。随后出现昏睡、轻度虚弱、喂养困难、口腔分泌物增多和异常哭声[119]。患儿最后不能控制头部，并可能出现眼肌麻痹、上睑下垂、面部表情弛缓、吞咽困难、其他脑神经损伤现象、广泛肌无力，最终导致呼吸功能不全与吞咽无能。婴儿肉毒中毒可能有一系列的临床特点，从不需要住院治疗的轻微症状到需要重症监护的严重肉毒中毒不等。2003 年，加州公共卫生部已经批准将中和 BoNT 的人免疫球蛋白(BabyBIG；静脉注射 BIG-IV)加入到婴儿肉毒中毒防治计划[www.infantbotulism.org，一周 7 天全天 24 小时电话，(510) 231-7600][117,120]。BIG-IV 或 BabyBIG 由免疫球蛋白组成，来源于用五价肉毒梭菌毒素免疫供体的混合血浆，起着中和游离肉毒梭菌毒素的作用。2007 年，这一计划已开始面向美国以外的患者进行一对一的治疗。早期治疗能够缩短住院时间，并能够显著降低住院治疗费用[121]。一项最近的 Cochrane 综述证明 BIG 的使用比其他药物干预方式更为有效，尽管这些研究质量中等[121]。

4. 作为生物恐怖制剂的肉毒毒素 肉毒梭菌制成的气溶胶和吸入剂会引起吸入性肉毒中毒，被认为是第五种肉毒中毒[122-123]。吸入性肉毒中毒也有可能由隐蔽的食物污染引起[110,122,124]。吸入性肉毒中毒已在猴身上进行了实验验证[110]；有 3 位德国兽医偶然因兔子和豚鼠皮毛上沾染的雾化 BoNT 的再次雾化而暴露[110]；另有 3 位研

究人员在操作 BoNT 期间暴露于气溶胶中[125]。恐怖分子试图在日本使用肉毒毒素气溶胶作为生物武器，但并未成功。虽然存在吸入肉毒毒素的可能，但是肉毒毒素在气溶胶状态下并不稳定，更有效的投毒方式是食品污染和口服中毒。吸入肉毒梭菌毒素约 6 h 后，暴露的人会出现麻痹，并伴有脑神经功能障碍，如复视、吞咽困难、瞳孔散大和上睑下垂。接着进展为需要机械通气的通气衰竭。没有发热和精神状态的改变[123]。马源性七价(A 到 G)抗毒素血清已获得美国 FDA 的批准，可从 CDC 获取用于肉毒中毒治疗[临床紧急肉毒中毒咨询和抗毒素服务提供 24 小时热线，电话(770) 488-7100]。在蓄意攻击中，不应使用用于婴儿肉毒杆菌中毒治疗的 BabyBIG(Baxter Healthcare)。

(六)破伤风

由破伤风梭菌引起的破伤风通常与无感染表现的刺穿伤有关。破伤风梭菌及其芽胞广泛分布于土壤和多种动物的肠道内容物中。强效的神经毒素(TeNT)常称为破伤风痉挛毒素，在伤口中产生，并迅速与神经组织结合，引起典型的麻痹与强直性痉挛[126]。破伤风类毒素免疫注射能够彻底预防破伤风。

破伤风与肉毒中毒类似，不同之处在于破伤风仅通过伤口感染并产生 TeNT 引起。TeNT 无活性的多肽链单体(150 kDa)经内在蛋白酶剪切产生其激活形式，由一条重链(100 kDa)和一条轻链(50 kDa)通过二硫键连接组成[109]。重链与神经细胞结合，其三维结构已被阐明[109]。轻链是一种锌内肽酶，能够通过逆向轴突运输进入细胞质并横穿神经末梢至神经元细胞体[126,146]，最后抵达脊髓和脑干神经元细胞影响甘氨酸和 γ-氨基丁酸(GABA)传递[109,126]。中枢神经系统神经元的冲动抑制信号受到阻滞，而运动神经传导继续进行，导致持续性肌肉痉挛，屈肌和伸肌痉挛能够持续数周。TeNT 抑制神经递质释放的胞吐作用的机制与 BoNT 类似；实际上 TeNT 在和 B 型 BoNT 相同的肽键连接位点剪切了囊泡相关膜蛋白[108]。与肉毒中毒在病理生理学上的不同之处在于，TeNT 在神经元中是逆向运输抵达中枢神经系统，两者的作用位点也不相同[109,126]。

据估算，全球每年发生破伤风多达 1 000 000 例[126-127]。因缺乏婴幼儿或成年女性破伤风免疫计划，新生儿破伤风在发展中国家呈地方性流行。可以通过对育龄妇女接种破伤风类毒素疫苗来预防新生儿破伤风。WHO 估计，2013 年新生儿破伤风致死约 49 000 名新生儿，与 1988 年(估计有 78.7 万新生儿死于破伤风)的情况相比，减少了 94%。在发达国家，注射毒品(如皮下注射)是重要的危险因素[128-129]。新生儿破伤风中，低体重新生儿病死率最高[130]。

(七)其他值得注意的梭菌

无害梭菌能够在免疫功能低下宿主体内引发菌血症，曾在复发性艰难梭菌相关疾病患者体内分离得到[131]。通常对多种针对厌氧菌感染的药物(万古霉素等)耐药[131]。多枝梭菌是儿童脓肿、腹膜炎、菌血症和慢性中耳炎[132]等患者临床标本中第二常见的梭菌(仅次于产气荚膜梭菌)，也是成人菌血症中第三常见的梭菌。同前文所述，第三梭菌常从免疫低下患者血培养中分离到，据报道可导致中性粒细胞减少性肠炎和脑膜炎[24,133]。哈氏梭菌和鲍尔特梭菌可从人类多种感染中分离得到[8,29]，包括一例致死性的败血症[134]。已从健康人的粪便和急性阑尾炎患者的血培养物中分离出哈氏梭菌[29,135]。表型类似的梭形梭菌也是人类感染中分离得到的最常见的梭菌之一，引起的感染较哈氏梭菌和鲍尔特梭菌更为严重，或者说更具侵袭性。

16S rRNA 基因测序技术的出现为先前错判和分类为梭菌的菌株提供了一种物种鉴定的方法。例如导致菌血症病例的哈氏梭菌[29]、肠梭菌(*C. intestinale*)[136]、共生梭菌(*C. symbiosum*)[137]；引起一例健康 16 岁少年致死性败血症的共生梭菌(*C. symbiosum*)[138]；引起脓肿的速生梭菌(*C. celerecrescens*)[139]等。未来可能进入能够更加精确描绘梭菌感染的分子鉴定技术时代。

五、梭菌性疾病的临床微生物学

(一)临床标本收集、转运和保存的常规方法

正确的选择、收集和转运临床标本对梭菌感染的实验室诊断非常重要。推荐的收集和转运的一般程序参考本书第 19 章。

(二)临床标本收集和直接检验的特殊方法

除了获得吸出物和组织外,一些梭菌性疾病需要特殊的标本。下面介绍这些标本的收集和直接检测方法。

1. 疑似气性坏疽和坏死性筋膜炎 气性坏疽是非常紧急的状况,需要快速的临床诊断。当怀疑为气性坏疽时,需要从感染活跃部位采集多种组织标本,因为梭状芽胞杆菌通常在病变的损伤组织中不均匀分布。伤口标本革兰染色涂片的直接检测对于气性坏疽早期初步诊断非常重要[77]。产气荚膜梭菌感染的典型表现包括无白细胞浸润,在损伤中心区域的涂片中有梭状芽胞杆菌存在。需要特别留意伴有或没有芽胞的革兰阳性杆菌,因为常见于伤口和脓液标本中的产气荚膜梭菌和多枝梭菌在组织中形成芽胞并不常见。在组织涂片中,产气荚膜梭菌通常体积较大,相对短而粗,是两端钝圆的革兰阳性棒状杆菌,常呈短链状排列;多枝梭菌更细长(图 55-1)。伤口涂片中产气荚膜梭菌有时会被包裹,这种境况常出现在流产后产气荚膜梭菌感染的子宫内膜标本涂片中。观察芽胞时,芽胞染色与革兰染色比较并没有优势,但是用相差和暗视野显微镜观察接近成熟期的芽胞更有效。如果出现芽胞,需要注意芽胞的形状(圆形或椭圆形)和位置(极端、次极端或者中间)。

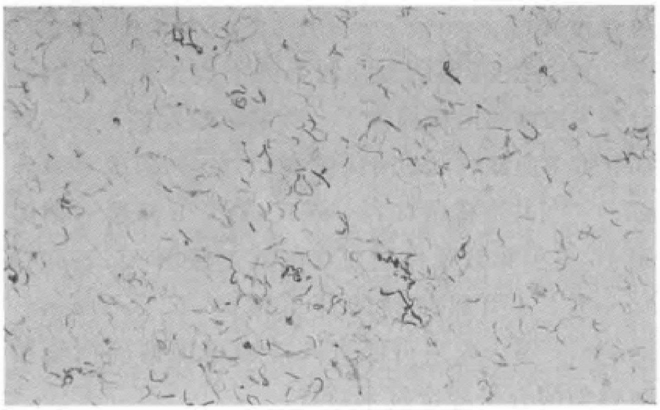


图 55-1 多枝梭菌的革兰染色。注意那些细长的、革兰染色多样的、有明显芽胞的杆菌。图片来源于参考文献[158],见彩插

2. 疑似产气荚膜梭菌食源性疾病 新鲜的粪便标本和可疑食品是产气荚膜梭菌培养和毒素检测的首选标本。这些标本必须装在无菌容器中4℃保存,并尽快冷藏运送。为了获得最佳结果,粪便标本必须在 24 h 内处理。棉拭子标本不适合做毒素检测,因为标本量不够。

尚无用于诊断产气荚膜梭菌相关性腹泻的“金标准”。有多种方法,如分离产气荚膜梭菌、分离产气荚膜梭菌并确定菌株类型(产毒菌株培养)、检测粪便中特定的毒素基因、检测粪便中的毒素等。Vero 细胞培养的方法没有其他方法敏感,重复性也不好[75,140-141]。用 RPLA 试剂盒的结果重复性好,测试反应灵敏;但是有报道称粪便中有非特异性干扰[140]。直接在粪便中检测产气荚膜梭菌肠毒素的酶免疫测定法(EIA)比 Vero 细胞测定法和 RPLA 更为灵敏和特异,是伦敦公共卫生胃肠道细菌参考实验室(GBRU)的首选方法。许多商品化的用于粪便中毒素直接测定的 EIA 系统已经研发出来并投入使用,比如 TechLab(Blacksburg, VA)的 EIA 和 Ridascreen (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany)[75,140-141]。有报道称粪便中的背景细菌 DNA 会干扰肠毒素基因 PCR 扩增或环介导等温扩增[140]。通常,检测产气荚膜梭菌肠毒素特定 *cpe* 基因的分子检测比体外 CPE 检测更容易些。可以用多重 PCR 对产气荚膜梭菌分子靶标和其他肠道致病靶标一起检测。粪便标本的收集时间非常重要,因为产气荚膜梭菌和肠毒素仅在肠道内短暂停留,在 1~2 天内被清除。GBRU 要求在出现胃肠道症状的 2~3 天内收集样本。参考实验室也可以为培养的产气荚膜梭菌提供分子分型(扩增片段长度多态性)服务,以进行疫情调查。重要的是至少检测三个菌落,以增加从非肠毒素生物中获得产肠毒素产气荚膜梭菌的机会。

3. 疑似坏死性肠炎(产气荚膜梭菌 C 型) 如果怀疑为坏死性肠炎,合适的标本包括 3 个不同静脉穿刺部位的血培养、大便(至少 25 g,如果是液体至少 25 ml)和肠腔内容物或相关的肠组织(如外科手术标本或者尸检标本)。标本必须在密闭、不泄漏的容器中转运,然后进行革兰染色、培养、分离、鉴定和产气荚膜梭菌的分型。产气荚膜梭菌基因分型 PCR 方法用于一些特定的研究,或者提供辅助诊断[40]。因此,可以从福尔马林固定的肠组织或者培养物中提取 DNA,并用 PCR 扩增产气荚膜梭菌 C 型的特异性基因 *cpa* 和 *cpb*[40]。

4. 疑似艰难梭菌感染 以下危险因素可以作为考虑对腹泻患者进行细致的CDI微生物学诊断的根据：①抗生素暴露；②宿主因素，比如老年（>65岁）、免疫抑制或者严重的潜在的下消化道疾病；③暴露于急性或慢性医疗机构[142-143]。把使用质子泵抑制剂作为一个危险因素仍存在争议[144]。不管医生的要求如何，微生物实验室都可通过检测住院超过2天的所有腹泻患者的松散未成形粪便标本帮助识别CDI[143]。由于在非易感人群中，CDI也被越来越多地认为是社区获得性腹泻，所以可考虑对所有腹泻样品进行CDI检测。当前用于肠道致病性微生物检测的多重PCR可容易地扩展至艰难梭菌。CDI是一种经多种实验室方法证实的临床疾病。自从高毒株如核糖体型027的出现后，CDI的诊断得到更多的关注，因为这些菌会增加感染发生率和严重程度。对于最恰当的诊断方法或推断规则目前仍有争议，但是方法主要分为3类：检测毒素A和毒素B[酶免疫测定法（EIA）和细胞培养细胞毒素中和试验（CCCNA）]、检测病原体[厌氧培养、谷氨酸脱氢酶（GDH）]和检测毒素基因的方法[核酸扩增试验（NAAT）][142-143]。因为非产毒株可以定植在人体，所以单纯检测病原体的方法必须与毒素检测的方法相结合，以评估毒素状态。

（1）送检标本：用于艰难梭菌培养和毒素检测的标本应该为单个、新鲜的粪便标本（理想的水样便体积为10～20 ml；至少为5.0 ml或5 g）。为了减少从只是定植了艰难梭菌的患者中获得阳性培养结果的概率，仅需要对液体或者不成形的大便标本进行处理。大便拭子标本因为量少而不能用于毒素检测。不过出于流行病学原因，棉拭子可以做培养或NAAT。其他合适的标本包括肠腔内容物和外科手术或者尸检的大肠标本。

标本必须在一个严格密封的、不渗漏的塑料或玻璃容器中运送。为了达到最佳的分离率，粪便标本必须在2 h内培养。虽然芽胞在冷冻粪便中能存活数天，但是在冷冻标本中艰难梭菌的活菌数量可能会大量减少。如果保存后要做培养，那么粪便必须放在厌氧环境（厌氧转运瓶或者转运袋）。在4℃放置不超过2天的粪便可以分离到艰难梭菌。做毒素检测的标本在4℃保存可长至3天，如果不能马上检测，就必须冻在－70℃。－20℃冷冻可导致细胞毒素活性的明显丢失，因此可能达不到可检测的水平。

检测方法仅推荐用于诊断CDI，不推荐用于判断是否治愈。因为尽管症状好转，许多患者在治疗结束时毒素检测和（或）产毒菌株仍为阳性。

（2）临床标本中艰难梭菌的检测方法

1）厌氧产毒培养：为了后续的抗生素药敏试验、分子分型和流行病学研究，应鼓励进行艰难梭菌的培养，它是两种诊断参考标准之一。厌氧培养和艰难梭菌的鉴定方法参看后面的“分离程序”。因为从粪便中培养艰难梭菌的方法不能评估毒性，因此培养方法经常要结合毒素检测。

2）（GDH）抗原检测诊断CDI：GDH是所有艰难梭菌都高水平表达的代谢酶，包括产毒株和非产毒株，所以当检测阳性时必须要结合毒素检测方法。GDH分析有两种形式，分别是固相微孔板和侧流免疫膜，都结合了毒素A和B EIA检测（文献[142]和[143]已作综述）。与产毒培养和CCCNA比较，GDH检测具有高阴性预测值（NPV），高达98.4%～100%[142-143]，至今最大一项CDI诊断研究项目的最新数据也确证了这点（相对于产毒培养和细胞毒素方法的NPV值分别为99.5%和99.8%）[145]。

3）核酸扩增方法：2009年，美国FDA批准了第一个核酸扩增方法。许多技术平台和检测技术方法获批，采用了不同的技术方法，包括PCR、环等温扩增技术和微阵列技术[142-143,146]。一些平台被设计成适用于小型实验室，而其他的平台更适用于高通量检测。这些方法检测诸多目标基因，包括*tcdA*、*tcdB*、*cdt*基因，以及*tcdC*基因上第117位点的缺失，后面两个基因可对核糖体027型菌株进行鉴定，尽管其他PCR核糖体型也包含此缺失。与GDH分析相似，对于粪便标本中是否存在产毒艰难梭菌，NAAT的NPV和分析临床敏感性很高[142-143,146]，但是特异性和阳性预测值（positive predictive value，PPV）值得担忧。在Dubberke等[147]的研究中，当用临床参数来评估方法的效果时，NAAT的特异性在所有诊断方法中最低。部分原因是测试标本分类不合适，因为被检患者中36%没有腹泻症状，20%用过通便剂[147]。而且，在英国一项超大规模前瞻性多中心研究中，作者发现NAAT阳性但CCCNA阴性与病死率和住院时间延长不相关[145]。作者认为NAAT方法会导致CDI过度诊断，因为NAAT

不能区分携带者和患者[145]。他们建议 NAAT 方法可以用于第一阶段来排除艰难梭菌，然后用更特异的毒素检测来识别那些最可能感染艰难梭菌的患者[145]。ECDC 也推荐这种带有直接毒素检测试验的两步法用于欧洲 CDI 监测[143]。另一种备选方案是在判断定植还是患病时对粪便样品中艰难梭菌的数量进行定量测定，因为定量 PCR 的低循环阈值与粪便标本中游离毒素的浓度相关[148]。尽管用于 CDI 诊断的新的单分子阵列技术正在研发中，无论先检测 GDH 还是 NAAT，主要的限制是缺少一个敏感的毒素检测方法。因此，建议采取两步或甚至三步方法，首先是 GDH 法，随后用毒素 EIA 法，最后用 NAAT 验证 GDH 阳性、毒素 EIA 阴性的标本[143]。

4)艰难梭菌毒素检测方法：虽然还没有一致认可的标准方法，但长期以来 CCCNA 被认为是艰难梭菌毒素检测的"金标准"。CCCNA 方法需要将粪便过滤后接种到单层合适的细胞系，37℃孵育 24～48 h 后观察细胞病变。可用的对毒素 A 和 B 敏感性不同的细胞系有包皮成纤维细胞、Vero 细胞、MRC-5 肺成纤维细胞及其他医学细胞系。一旦出现细胞病变，就需要用索氏梭菌或者艰难梭菌的抗血清中和试验评估细胞病变的特异性。TcdA 阴性、TcdB 阳性的菌株与同时产生这两种毒素的菌株引起的细胞病变不同，且难以识别。方法的局限性是需要做中和试验。CCCNA 方法不稳定，而且该方法可能与参比方法和影响准确性的技术因素相关(综述见参考文献[142]和[143])。然而英国一项大规模前瞻性研究表明，与检测病原菌的方法相比，用 Vero 细胞做 CCCNA 检测的临床相关性更好[145]。因为许多实验室愿意用分子技术检测病毒，所以放弃细胞培养实验间，这样也导致 CCCNA 很少用于艰难梭菌诊断。另外，检测周期也限制了细胞培养方法的应用(表 55-2)。

表 55-2 诊断艰难梭菌疾病常用的检测方法

检测对象	方法	主要优点	主要缺点
细菌	厌氧毒性培养	敏感、特异 必须结合毒素检测	缺乏统一标准 用于流行病学 需要 2～5 天 费用高
谷氨酸脱氢酶(GDH)	固相微量滴定 EIA 结合毒素 EIA 的膜 EIA	快速、高 NPV 快速、高 NPV	不能区分产毒和不产毒的艰难梭菌，必须结合毒素检测 EIA 毒素检测方法敏感性不高 GDH 阳性，毒素 EIA 阴性的结果必须用另一种方法确认，比如 NAAT
毒素 B	细胞培养中和法	敏感、特异	需要 24～48 h 完成 需要专业技术
毒素 A 和 B	固相微量滴定 EIA 膜 EIA	快速、不贵	所有结果的敏感性低(<90%) 特异性也有差别
基因编码毒素 A 和 B，二元毒素，以及 *tcdC* 基因第 117 位点缺失	NAAT	快速、容易操作、敏感、高 NPV	用得不合适时 PPV 就低 费用问题

毒素免疫法诊断 CDI：很多商品化的 EIA 可用于艰难梭菌毒素的检测。这些方法用包埋在横向免疫层析膜或者微孔固相设备中的单克隆或多克隆抗体单独检测毒素 A 或者同时检测毒素 A 和 B。毒素检测的结果就代表标本毒素阳性或者阴性，跟 TcdA 和 TcdB 结果没有区别。不推荐单独检测，因为一些流行株只产 TcdB[52]。尽管 2010 年之后检测性能明显改善[43]，TcdA 免疫测定法的敏感性和特异性都比 CCCNA 低(分别为 31% *vs.* 99%和 84% *vs.* 100%)[142-143]。这样的区别导致一般要送多份标本给实验室("粪便是艰难梭菌的 3 倍")，增加了检测费用，降低了 PPV[173]。由于这些方法的敏感性和特异性差，EIA 不是诊断 CDI 的最佳选择，很多实验室用基于 GDH 或者 NAAT 的检测流程替代了 EIA 方法。总的来说，很多诊断检测方法都可用于艰难

梭菌疾病的诊断(表55-2)。

艰难梭菌检测流程:什么方法最恰当仍存争议[143]。根据欧洲临床微生物学和传染病学会(ESCMID),基于GDH或NAAT检测的初步结果,后续进行敏感性好的毒素检测的两步法是目前的最佳选择。EIA用于毒素检测缺乏敏感性和特异性。CCCNA阳性结果与患者结局不良的符合率最好。初始NAAT试验阳性,接着毒素检测试验阴性的患者应进行临床评估:他们或者是真正的感染者(毒素水平低于毒素EIA的阈值检测水平),或者仅是产毒株的携带者。如果初始试验检测GDH,则第三步可选择产毒培养或NAAT以区分产毒和非产毒菌株[143]。三步法可能会延迟CDI诊断,成本效益也可能较低。不管使用什么方法,只检测具有相应临床症状的患者可提高诊断准确性。作为两步法的替代方案,IDSA/SHEA(美国传染病学会和美国公共卫生流行病学会)指南建议,不对服用了泻药或无腹泻的患者进行检测,从而提高了验前概率的时候,NAAT法可单独使用[149]。

5. 疑似败毒梭菌引起的中性粒细胞减少性小肠结肠炎 对于疑似败毒梭菌引起的中性粒细胞减少性小肠结肠炎,可选择的标本有:①三种不同静脉穿刺位点的血培养标本;②粪便(至少25 g,如为液体需25 ml);③外科手术或者尸检的回盲肠腔内容物或组织,在密封、防泄漏的容器中转运。另外,如果疑似为肌坏死或者另一种进行性感染,必须要采集肌肉的活检标本(或者用针和注射器在感染部位抽取液体)。

6. 疑似肉毒梭菌或者破伤风梭菌感染或中毒 实验室通过在血清、粪便或食物中检测到肉毒梭菌毒素,或从粪便、伤口或食物中培养出肉毒梭菌、丁酸梭菌或巴拉特梭菌来确认肉毒中毒。大多数医院实验室都没有合理地配备相应的设备处理疑似肉毒毒素中毒的患者标本。所有欧洲国家都将肉毒中毒列为法定疾病(https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/botulism-annual-epidemiological-report-2016-2014-data)。在美国,收集标本前,医疗机构一旦怀疑患者为肉毒中毒必须立即拨打州立卫生部门24 h紧急电话或联系位于佐治亚州亚特兰大市的疾病预防控制中心(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)[(770)488-7100,24 h×7天紧急服务],以便开展确诊、治疗和案例调查。对于婴儿肉毒中毒,加利福尼亚州公共卫生部的婴儿肉毒中毒治疗和预防计划提供24 h×7天的咨询服务,可以通过(510)231-7600与之联系。在加拿大,疑似肉毒中毒的案例必须通过下列网站上报(http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/guide-ld/botulism-botulisme-profeng.php)。在欧洲,每个国家都为识别和诊断肉毒中毒提供支持。ECDC为涉及两个或两个以上欧盟成员国的疫情暴发提供支持。

可接受的标本包括粪便、灌肠液、胃抽出物或者呕吐物、组织或者渗出液和尸检标本。这些标本必须放在无菌、不易碎的容器中。血清标本(最好>10 ml)必须在出现症状后尽快采集。临床拭子必须采集在厌氧转运培养基中;外环境拭子(可能分离到芽胞)可以在没有任何培养基的塑料容器中运送。食物标本必须在原来的容器中,如果可能的话,可以放在无菌、不易碎的容器中转运。所有标本必须保存在4℃,尽快冷藏运送。更多信息可以查询CDC肉毒中毒网站(http://www.bt.cdc.gov/agent/botulism)。实验室必须同时获得相关信息和联系号码。当调查可能发生的生物恐怖活动时,血清、胃抽出物、粪便和环境或者鼻拭子都可能检测出可能被吸入的雾化了的肉毒毒素[174-175]。所有标本必须冷冻保存直至转运到检测实验室(检测项目包括培养、毒素基因PCR扩增和直接梭菌毒素检测等)。某些梭菌毒素,尤其是BoNT、TeNT和iota毒素是极其有毒的分子,属于剧毒品。CDC建议具有生物安全3级实验室和个人防护才能开展BoNTs研究。条件允许的话,实验室工作人员必须接种五价(A到E)类毒素;实验室必须张贴生物安全手册,必须包含紧急电话号码和应急处理程序。现行美国管理研究某些药剂人员安全规范包含在电子的联邦管理准则(http://www.ecfr.gov)和CDC的微生物学和生物医学实验室生物安全指南手册中(http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5)。在加拿大,生物安全标准在http://canadianbiosafetystandards.collaboration.gc.ca/能找到,毒素操作必须遵守加拿大人类病原体和毒素法案(http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/regul/hpta-lapht-eng.php)。

破伤风被认为是一种很难通过实验室检查确

证的临床综合征。可能没有受伤史或明确的侵入门户。大多数破伤风患者无法检测到抗破伤风抗体，但是许多报道证明破伤风患者的抗体浓度比预期的保护性浓度高。免疫球蛋白治疗前必须收集样品。部分病例(30%)可从伤口处获得破伤风梭菌。可通过直接PCR和严格的厌氧培养方法在感染部位检测出产破伤风毒素的破伤风梭菌，但阴性结果并不除外破伤风[127,152]。所有产毒菌株的质粒上都有编码破伤风痉挛毒素(Tetanospasmin)的基因，但是，破伤风梭菌可能存在于具有保护性免疫力的患者体内而不引起破伤风。血清中检测到破伤风毒素，证实临床诊断。血清中没有毒素并不能排除临床诊断。

直接毒素检测：检测BoNT和TeNT的生物学方法是目前最重要的诊断肉毒中毒和破伤风的实验室方法[98]。最常用的是小鼠致死试验，该方法是测定96 h内杀死50%小鼠需要腹膜腔内注射毒素的量。检测到BoNT(不是细菌)可以明确诊断肉毒中毒[98]。当前，唯一可靠的BoNT检测方法是小鼠生物测定，结合使用型特异性抗毒素中和小鼠毒性试验[98,153]。检测神经毒素经常使用粪便、血液(血清)、食源性肉毒中毒时的可疑食物和微生物液体增菌培养物[98]。酶联免疫吸附试验、细胞培养系统[154]和生物传感器平台[155-156]也可以用于BoNT检测[156]。实时荧光PCR方法可用于检测肉毒梭菌BoNT基因特异性片段BoNT A、B和E，可以作为小鼠生物测定的备选方法；这个方法的敏感性和特异性与常规方法相似[152,157]。PCR检测潜在的问题是有些菌株虽携带基因却不产生毒素。这样，就需要选择生物测定方法。

六、分离程序

(一)平板培养基上的分离和形态

下面概要描述梭状芽胞杆菌的培养和分离程序。梭菌在商业化的CDC厌氧血琼脂和苯乙醇血琼脂(phenylethyl alcohol blood agar，PEA)上培养1～2天后生长良好。含5%羊血的布氏琼脂、哥伦比亚琼脂或者添加酵母浸出液、维生素K和氯化血红素的脑心浸出液琼脂都可以作为非选择性血琼脂培养基。不同培养基上的菌落特征不同。如果菌落似羽毛状，就要怀疑是不是败毒梭菌或破伤风梭菌。似羽毛状菌落是破伤风梭菌的一个典型和独特的特征，很容易因为长满整个培养基表面而被忽略。一些种，比如产气荚膜梭菌，在过夜培养或者最短6 h就可形成菌落。当怀疑伤口或者脓肿标本(如气性坏疽)有梭菌时，必须同时接种卵黄琼脂(改良的，见第20章)。

培养后，血琼脂和苯乙醇血琼脂培养物必须在解剖显微镜下镜检，观察溶血方式、菌落结构和成群移动或有动力的菌落。在卵黄琼脂上观察卵磷脂酶(图55-2)或脂肪酶产物。卵磷脂酶活性表现为琼脂上出现不溶的、不透明的、稍白的沉淀。第三种在卵黄琼脂上可见的反应是蛋白质水解，表现为菌落周围的半透明圈。在Jousimies-Somer等推荐的氯化血红素卵黄琼脂、Lombard-Dowell卵黄琼脂、改良的McClung-Toabe卵黄琼脂上可以观察到同样的反应[158-160]。

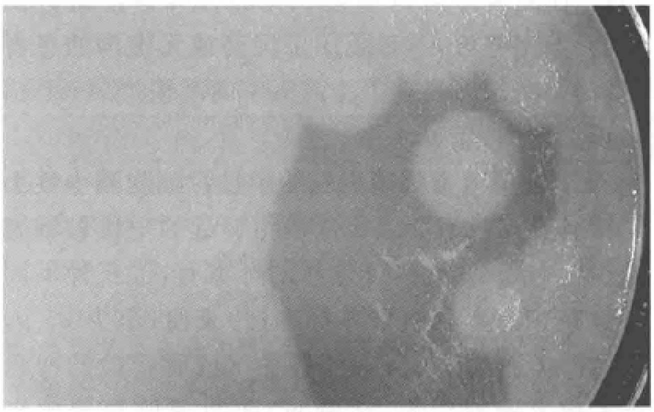


图55-2 卵黄琼脂上的卵磷脂酶反应。注意菌落周围由于复合脂肪沉淀产生的不透明晕环。图片来源于参考文献[158]，见彩插

(二)芽胞选择技术

加热和乙醇处理程序能够帮助检测芽胞[158]。如果标本中含热敏的梭菌(比如食源性暴发中的肉毒梭菌E型和一些产气荚膜梭菌)，乙醇比加热更有效。当标本不完全均质化时加热处理比乙醇更有效，因为标本中含有的颗粒物质无法被乙醇充分渗透。对于任何芽胞选择技术，应当进行无处理对照传代培养。

乙醇处理时，在无菌螺盖管中将1 ml粪便悬浮液，或者伤口或渗出液的匀浆与等体积的无水乙醇(或95%)混合。标本在室温条件下(22～25℃，1 h)轻柔混匀。Ames等分混匀器能够持续

混匀，使用方便。处理过的标本接种到葡萄糖-庖肉培养基或者巯基乙酸盐培养基、厌氧血琼脂，或者卵黄琼脂。培养物孵育后观察生长情况。

加热处理时，一管葡萄糖-庖肉培养基或巯基乙酸盐培养基(5 ml)在80℃水浴中预加热5 min，然后加入1 ml标本混悬液。培养物在80℃孵育10 min，然后将试管移到冷水中冷却。处理过的标本混悬液传代到未加热的葡萄糖-庖肉培养基或巯基乙酸盐培养基、厌氧血琼脂或卵黄琼脂。培养物厌氧孵育后观察生长情况。

(三)艰难梭菌分离和鉴定

实验室获得的艰难梭菌感染已有报道，产生传染性气溶胶的实验操作必须在生物安全柜中进行。常规培养是在35～37℃，培养基预还原有利于生长。生长需要严格厌氧条件。一般来说，培养时间因采用的方法需要2～7天不等。因为艰难梭菌能从无症状患者的粪便中分离出来，仅凭培养不足以诊断CDI，并可能会误诊为其他原因引起的AAD，除非粪便标本同时检测艰难梭菌毒素。然而，最近出现了高毒株的流行强调了艰难梭菌培养为其后开展分型、分子研究和抗生素敏感检测的必要性。

很多培养基可以用于粪便标本或直肠拭子分离艰难梭菌，但是很少有研究比较培养基和培养条件。最初George等[161]报道的环丝氨酸头孢西丁果糖琼脂(cycloserine-cefoxitin-fructose agar，CCFA)是利用艰难梭菌发酵果糖的生化反应特点。选择剂D-环丝氨酸(500 μg/ml)和头孢西丁(16 μg/ml)抑制大多数肠杆菌科细菌、肠球菌和葡萄球菌、革兰阴性厌氧杆菌及除艰难梭菌外的梭菌的生长。但是，一些艰难梭菌菌株对抗生素环丝氨酸和头孢西丁的最小抑菌浓度(MIC)均较低，最佳抗生素浓度建议为环丝氨酸125 μg/ml，头孢西丁4 μg/ml。替代方案是诺氟沙星和拉氧头孢作为选择剂，作为市售的CDMN(艰难梭菌拉氧头孢诺氟沙星)补充剂。随后，添加剂如蛋黄乳剂、马血清、牛磺胆酸盐、对羟基苯乙酸和溶菌酶等可以提高阳性培养[142-143,162]。蛋黄乳剂有助于区分艰难梭菌和卵磷脂酶阳性梭菌。当使用紫外光对培养物进行检查时，将裂解的马血添加到培养基可增强对菌落荧光的识别。存在于培养基中的胆酸(牛磺胆酸盐)可在电击处理后促进芽胞生长，对羟基苯乙酸可增加对甲酚(艰难梭菌的独特代谢物)的产生。研究表明，显色培养基跟其他选择培养基一样敏感，甚至更快速，培养24 h内就出现可鉴别的菌落[163-164]。这些产品的主要缺点是费用高。此外，某些艰难梭菌菌株，尤其是PCR核糖体分型为023以及056、058、059和248的菌株，在显色培养基上不产生色素[165]。

有报道称标本转种到含牛磺胆酸的增菌肉汤分离效果最好，比如含溶菌酶半胱氨酸牛磺胆酸的环丝氨酸头孢西丁甘露醇肉汤(cycloserine-cefoxitin-mannitol brolth，CCMB-TAL；Anaerobe Systems，Morgan Hill，CA)[140,166-167]。如果不用增菌肉汤，就需要用芽胞富集步骤，无论乙醇或热休克都可以增加艰难梭菌在选择性培养基上的分离[167]。增菌液的培养期应延长到7～10天，但在接种少量芽胞过程中应注意防止环境污染。

孵育后，平板必须用解剖显微镜观察。艰难梭菌的菌落呈白色微黄、圆形不规则、扁平、有根状或者边缘不规则、磨砂玻璃样外观(图55-3)。菌落有特殊的气味，像对甲酚(或者马粪)。另外，CCFA上艰难梭菌菌落在紫外灯下发黄绿色荧光[158]。



图55-3 艰难梭菌在CCFA上。注意黄色的磨玻璃样的菌落。图片来源于参考文献[158]，见彩插

艰难梭菌革兰染色显示为棒状，革兰阳性或多变(Gram positive to Gram variable)，细长，两边平行，0.5 μm宽，3～5 μm长。因为繁殖型和芽胞形成细菌共存，分离可能很困难。可以通过典型菌落形态、革兰染色形态、特征性气味来初步鉴别艰难梭菌。最简单的鉴定方法是艰难梭菌乳胶凝集试验(各种不同公司的产品)或检测脯氨酸氨肽酶。明确的鉴别依靠GLC、菌株生化特性、

16S rRNA 基因测序，或者基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）产生的特殊的短链脂肪酸代谢产物带型[13,168-170]（表 55-1）。后者可能在有技术条件的实验室中取代其他耗时又昂贵的方法（见下面的“其他梭菌的鉴定”）。对可疑菌落经常采用多重 PCR 技术进行各种毒素基因的检测和鉴定[169-170]。

七、其他梭菌的鉴定

（一）初步鉴别

快速鉴定出菌血症中的致病微生物，对于指导适当的抗菌治疗和确定潜在的感染源都很重要。MALDI-TOF MS 并不总是适用于从阳性血培养瓶中对革兰阳性细菌进行直接鉴定。已经开发出了一种替代方法，该方法将 MALDI-TOF MS 应用于在固体培养基上短暂孵育的细菌培养物，这应该能够帮助医生快速识别严重的梭菌感染[171-172]。

感染部位标本由于微生物混合，从中鉴别出梭菌很耗时而且昂贵。用有选择性的和不同的培养基做初始分离可以为临床医生提供快速和相关的信息。当从正常无菌部位和感染严重的部位分离时，细菌必须完全鉴别。一些能确保鉴别的微生物包括败毒梭菌（与胃肠道恶性肿瘤相关）、多枝梭菌、无害梭菌和梭形梭菌（经常抗生素耐药）与产气荚膜梭菌[196]。

梭菌在显微镜下的形态为典型的革兰阳性杆菌。一些梭菌可见革兰阴性，尤其是多枝梭菌、无害梭菌和梭形梭菌群，但是特殊效力的抗生素纸片特征（见下述）证明了革兰阳性菌的存在。其次，芽胞很难检测，所以需要用孔雀绿染色，用相差或暗视野显微镜有助于观察。第三，纯培养的菌落形态多变，所以培养物看起来是混杂的。纯的单菌落传代培养也会产生同样的多变形态。用立体显微镜能有效观察菌落特征。第四，耐氧的梭菌可能与芽胞杆菌或乳酸杆菌的一些种混淆。梭菌属只在厌氧条件下形成芽胞，厌氧条件生长更好（比较大的菌落），触酶几乎全部阴性。芽胞杆菌属只在需氧条件下形成芽胞，在需氧条件下生长更好，常见触酶阳性。需氧生长的第三梭菌的菌落和细菌形态都与乳酸杆菌属相似。某些梭菌可以简单通过革兰染色、菌落形态差别、吲哚阳性反应、血琼脂上溶血及下表中的方法来鉴别（表 55-3）。

表 55-3 有临床意义的一些卵磷脂酶阳性和（或）成群游动（swarming）梭菌种的快速鉴别[a]

种	卵磷脂酶	脂肪酶	吲哚	成群游动	尿素	芽胞位置	其他特性
双酶梭菌 *C. bifermentans*	+	−	+	−	−	ST	卵黄琼脂上粉笔白色菌落
诺维梭菌 *C. novyi*	+	+	−	+	−	ST	完全的 β-溶血
产气荚膜梭菌 *C. perfringens*	+	−	−	−	−	ST	β-双溶血环，反向 CAMP 试验阳性
索氏梭菌 *C. sordellii*	+	−	+	−	+	ST	大的，革兰阳性杆菌
败毒梭菌 *C. septicum*	−	−	−	+	−	ST	罕见芽胞，扩散黏附菌落
产胞梭菌 *C. sporogenes*	−	+	−	+	−[+]	ST	大量椭圆形芽胞
破伤风梭菌 *C. tetani*	−	−[w]	v	+	−	T	鼓槌形

注：[a] 本表部分信息同表 55-1。+. 阳性反应；−. 阴性反应；v. 可变的反应；w. 弱阳性反应；ST. 次端生；T. 端生

1. 特殊效力的纸片 菌株必须转种到含万古霉素（5 μg）、卡那霉素（1 mg）或多黏菌素（10 μg）纸片的血平板上，35～37℃厌氧培养 48～72 h。梭菌属对多黏菌素耐药，对卡那霉素和万古霉素通常敏感（表 53-3），仅无害梭菌会对万古霉素表现为固有的低水平耐药[158]。

2. 卵磷脂酶和脂肪酶 菌株必须转种到卵黄琼脂上，35～37℃厌氧培养 48～72 h。卵磷脂酶活性表现为围绕菌落出现白色不透明的扩散区（图 55-2）。脂肪酶活性表现为在细菌生长的表面和菌落周围的培养基表面出现荧光光泽。

3. 芽胞试验 用来证实芽胞的培养基包括庖肉琼脂或肉汤和巯基乙酸盐培养基。除了产气荚膜梭菌（必须在 37℃）以外，梭菌必须在厌氧条件下低于最适温度 5～7℃（30℃）的温度生长和形成芽胞。生长活跃的培养物可以在室温存活数日到 1 周，并能按照上述方法进行乙醇或加热芽胞处理。

(二)梭菌种的明确鉴别

传统梭菌的表型特征和鉴定方法是用 PRAS 培养基结合代谢终产物 GLC 分析检测发酵谱和其他特性[168]。然而,只有少量实验室有 PRAS 培养基或 GLC。表 55-1 罗列了用于明确鉴别临床相关梭菌的特征。关键反应(表 55-1 中黑体)需要至少 PRAS 培养基与商业化的鉴别试剂盒联合使用或单独的预处理的酶反应,比如 Wee 纸片(Key Scientific, Round Rock, TX)或者 Rosco 诊断纸片(Rosco, Taastrup, Denmark)。明胶和七叶苷水解、糖发酵反应和代谢终产物分析都基于 PRAS 培养基获得的结果。

1. PRAS 生化接种 生长活跃的肉汤培养物(不含糖)或者肉汤培养基中的菌悬液(如蛋白胨-酵母或者巯基乙酸盐)都可用于接种 PRAS 培养基。培养物在 35~37℃孵育 48~72 h,但很多梭菌过夜培养已经足够。

2. 明胶水解 将生长活跃的培养物接种到 PRAS 明胶管,同时用一未接种管做对照,冷冻放置至少 1 h。将管子转移到室温,立即颠倒,每 5 min 观察液化。如果是阳性反应,明胶被水解软化,立即从颠倒的试管顶部滴落[158]。如果是阴性反应,达到室温时(>30 min)培养基不会液化。当达到室温时(>30 min)培养基成为液态则为弱阳性反应。

3. 七叶苷水解 在细菌生长活跃的 PRAS 七叶苷管中加入 5 滴 1%枸橼酸铁铵,可以观察到颜色变化,并在紫外光(366 nm)下观察荧光。阳性反应会逐渐变成黑色或深棕色,紫外光下无荧光。阴性反应则没有颜色变化,紫外灯下有蓝白色荧光。因为许多梭菌产硫化氢(H_2S),也会形成黑色的复合物,因此所有添加试剂后变黑的试管必须在紫外灯下确认[158]。

4. 糖发酵反应 细菌生长活跃(浊度>2+)的 PRAS 糖发酵管必须测定 pH。阳性反应("产酸")结果 pH≤5.5,阴性反应结果为 pH≥5.9。pH 5.6~5.8 为"弱酸性"。表 53-1 中列出的分析代谢终产物的 GLC 操作细则可见于文献[158]。

基于检测显色或荧光底物的预处理酶的商业化试剂盒可用于快速检测厌氧菌。这些试剂盒包括 RapID ANA Ⅱ(Remel)、API 20A 和 Rapid ID 32A(bioMérieux, Durham, NC)、VITEK ANI 卡和 VITEK 2 ANC 卡(bioMérieux),以及 BBL Crystal 厌氧菌鉴定系统(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)。这些试剂盒的总体表现不同,单独用于梭菌鉴定都不能令人满意[173-174]。总的来说,革兰染色反应、细菌形态学、菌落特征和菌株的耐氧特性(上面提到的特性,见表 55-1 和表 55-3)必须连同商业化微系统共同鉴定。选用单独的纸片(如 Wee 纸片或者 Rosco 纸片)作为这些试剂盒的补充是很有用的。其他有用的梭菌补充试验包括上面概述的试验,如脂肪酶和卵磷脂酶产物、硝酸盐还原反应、明胶和七叶苷水解、糖发酵、GLC 分析代谢终产物。

梭菌的生化活性差异很大,从分解糖/水解蛋白和分解糖/不水解蛋白到不分解糖都有。鉴别不分解糖的种最为复杂。这种情况下液相色谱-质谱联用技术[175]和分子生物学方法如 16S rRNA 基因测序[18,27]都很有用。16S rRNA 基因测序方法越来越普及,尽管结果的解释需要专门培训。其他鉴别梭菌好的方法还有荧光原位杂交反应[176-177]和 MALDI-TOF MS[178]。

5. MALDI-TOF MS 鉴定 大量关于应用 MALDI-TOF MS 鉴定包括梭菌属在内的厌氧菌的报道已经发表。在第 5 章已经详细描述过这个方法,它能够鉴定核糖体蛋白质分子量范围在 2~20 kDa 的微生物。两个商业化的 MALDI-TOF MS 系统分别是 Bruker Microflex (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany)和 VITEK MS (bioMérieux)(以前是 Shimadzu MS; Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)。

一篇最早专门评估应用 MALDI-TOF MS 鉴定厌氧菌的文章主要研究优化用于梭菌属菌株特性的鉴定系统[178]。研究选择了代表 31 个不同种的 64 株参考菌株,包括不同的肉毒梭菌亚型和一些难于鉴别的菌株,如肖韦梭菌(*C. chauvoei*)和腐败梭菌。此研究中所有 31 个种显示了特征性的质谱型别,能够明确鉴别到种,可以生成与 16S RNA 基因测序相似的系统树。相同种的菌株聚类到同一个组,包括肉毒梭菌代谢组[178]。作者认为 MALDI-TOF MS 能够替代麻烦而且经常不准确的生化方法来鉴定梭菌[178]。

在 Grosse-Herrenthey 等[178]里程碑式的研究之后,大多数评估 MALDI-TOF MS 应用于梭菌鉴定的研究都评估了大量从临床标本分离的不同

厌氧菌，一般也包括很少的梭菌[179,185]。结论是MALDI-TOF MS鉴定梭菌属菌种比市售生化系统更准确。

3个小组直接比较了用Shimadzu/bioMérieux VITEK系统和Bruker系统[186-188]鉴定不同的厌氧菌。两个系统用于鉴定当时各自数据库里的梭菌都很好。在一个比较提取方法的研究中，多枝梭菌是唯一需要用甲酸预处理才能精确鉴定的种[188]。

当评估文献时要考虑的几个重要内容包括仪器的厂家、使用的方法（直接涂靶板与预处理后涂靶板或提取蛋白质涂靶板）、数据库的软件版本和进行细菌分析的菌库的版本。调查者发现，对于很多属、种的厌氧菌，在含甲酸的平板上直接涂菌，不需要提取就可产生可接受的结果[180,183,188]。2个研究组都注意到MALDI-TOF MS主要受制于菌库中厌氧菌的种类数[180,183]。因为数据库频繁升级，用户需要厂家提供最新的信息。

Reil等[189]阐述了MALDI-TOF MS对艰难梭菌分型的潜力。应用MALDI-TOF MS分析29种艰难梭菌PCR核糖体分型菌株在2～20 kDa范围内的波峰，可以将PCR核糖体001、027和078/126菌株区分开来。另一项研究使用了基于高分子量特征性蛋白质波峰（分子量范围为30～50 kDa）的MALDI-TOF MS法，分析蛋白质提取物中2～20 kDa范围内的峰，并以PCR核糖体分型为参照对结果进行评价[190]。在涵盖59种PCR核糖体类型的500株菌中，总共可以鉴别35种高分子量蛋白质波峰类型。尽管与PCR核糖体分型相比，该方法的分辨率较低，但快速简便，为快速识别新出现的艰难梭菌PCR核糖体型提供了机会，如核糖体027型和078型[190]。

(三)常见梭菌的特性

有助于初步鉴定大多数常见种的关键特征如下。也可见表55-1和表55-3。

双酶梭菌：卵黄琼脂上菌落呈粉笔白色；不规则，边缘扇形；许多游离芽胞，常呈链状；脲酶阴性；吲哚和卵磷脂酶阳性。索氏梭菌与之相似，但通常脲酶阳性。

鲍尔特梭菌：常见菌落边缘稍不规则；菌落周围的琼脂变绿；革兰阴性；末端锥形；罕见芽胞；乳糖阴性，β-*N*-乙酰氨基葡糖苷酶（β-NAG）阴性。

丁酸梭菌：非常大，菌落不规则，内部结构斑点马赛克状；次端芽胞；发酵多种糖。

尸毒梭菌：白灰色；光滑或轻微不规则；表面微凸；顶端椭圆芽胞；斑点吲哚阳性。

梭形梭菌：和鲍尔特梭菌相同，但乳糖阳性，β-NAG阴性。

艰难梭菌：菌落黄奶油色或灰白色（图55-3）；不规则，粗糙，内部结构斑点马赛克状；表面不光滑或浑浊；马厩味（对甲酚）；次极端游离芽胞或者芽胞不常见；明胶缓慢水解；甘露醇和脯氨酸阳性；在选择性CCFA上菌落发黄绿色荧光。

乙二醇梭菌：菌落灰白色，边缘光滑或扇形；次极端游离芽胞。

哈氏梭菌：和鲍尔特梭菌相同，但乳糖和β-NAG阳性。

无害梭菌：灰白色或亮绿色菌落；内部结构粗糙斑点马赛克状，常见边缘光滑；顶端芽胞很难发现；没有动力；甘露醇阳性；乳糖、麦芽糖和脯氨酸阴性。

诺维梭菌A型：卵磷脂酶和脂肪酶阳性；可呈群集；完全β溶血。

产气荚膜梭菌：菌落周围双层β溶血环（图55-4）；棚车形杆状；罕见芽胞；卵磷脂酶阳性（图55-2）。

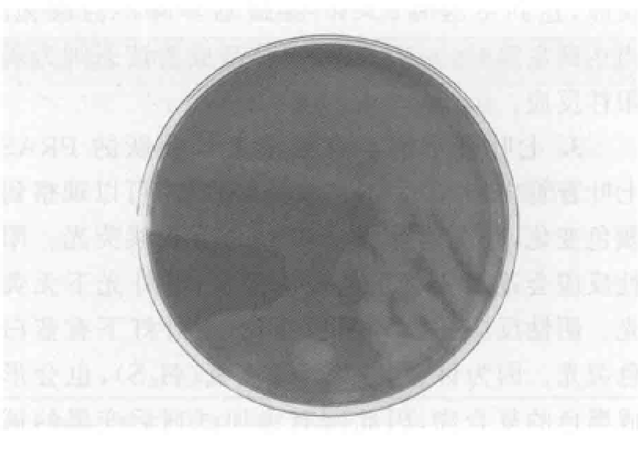


图55-4 产气荚膜梭菌在血琼脂上产生的双层β溶血环。图片来源于参考文献[158]，见彩插

多枝梭菌：菌落类似于脆弱拟杆菌，但是边缘常见轻微不规则；革兰染色多变；栅栏状细长棒状；圆形或椭圆形顶端小芽胞（图55-1）；没有动力；甘露醇阳性。

败毒梭菌：密集（图55-5）；大的、细丝状杆菌（图55-6）；次极端芽胞常呈“柠檬”形；DNA酶阳性，蔗糖阴性。

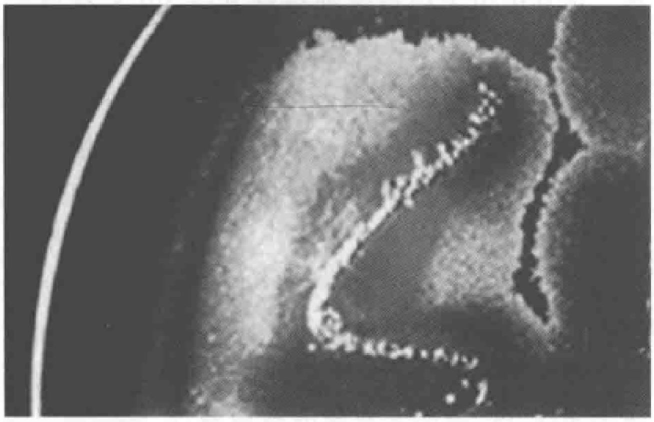


图 55-5　腐败梭菌在血琼脂上培养 12 h。注意扩散的菌落。E. J. Baron 提供，见彩插

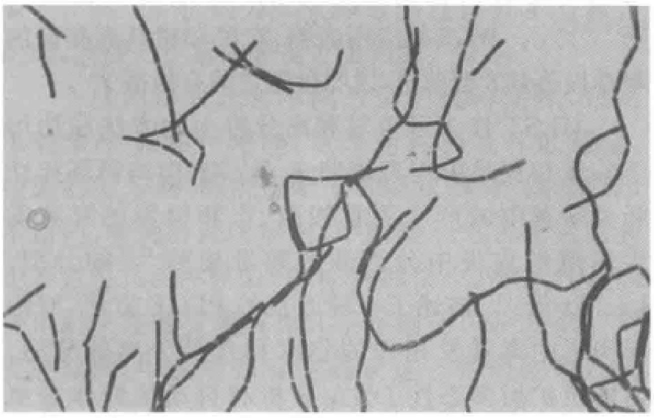


图 55-6　腐败梭菌的革兰染色。注意长的丝状杆菌，罕见芽胞。E. J. Baron 提供，见彩插

产胞梭菌：菌落假根状；可呈群集；菌落紧密附着在琼脂上；次极端和许多游离芽胞；脂肪酶阳性。

共生梭菌：末端锥形的棒状，橄榄球形；可能形成链状；常见芽胞。

第三梭菌：耐氧；厌氧培养时末端芽胞。

破伤风梭菌：在整个琼脂平板上薄膜状生长，尤其是在湿润的培养基上；鼓槌状芽胞。

鉴定某些种的时候需要检测毒素。产胞梭菌只有通过毒素检测才能与肉毒梭菌蛋白水解Ⅰ群菌株区分开。一些肉毒梭菌菌株产生卵磷脂酶和脂肪酶，只有通过毒素检测才能与诺维梭菌 A 型区分。作为上述方法的补充，肉毒梭菌及其他梭菌的不同型能通过它们 CFA 谱的不同和分型方法做初步鉴别，例如脉冲场凝胶电泳（pulse-field gel electrophoresis，PFGE）或其他分子分析方法。Finegold 等[8]描述了一种快速区别梭状梭菌群的3个种的多重 PCR 方法。

八、分型系统

艰难梭菌的分型有助于认识感染的流行病学，由于出现高毒株引起的暴发，它的重要性愈发明显。要研究艰难梭菌的流行病学，分型方法必须具有足够的分辨率、分型能力（对分离株进行明确的分析）、可重复性和可运输性（在不同实验室不同时间点以完全兼容的方式可重复执行该方法的能力）。并且相对容易操作[191]。在社区严重病例数增加或者医院内感染数增加的事件中，菌株分型可以提供关于优势的、更具传染性菌株的有用信息。这可能在局部发生，如在一所学院型医院的小规模暴发中鉴定出艰难梭菌 PCR 核糖体 826 型[192]。此外，基于国家医院的 CDI 监测可能会发现新的高毒性类型菌株在医院之间的传播，如波兰的核糖体 176 型[193-194]。PCR 核糖体分型法还可用于比较动物、人和食物中各种类型艰难梭菌的分布情况，这可能表明一种趋势，特定的 PCR 核糖体型菌株倾向于食源性疾病或人畜共患病。例如，在人类中新出现的艰难梭菌核糖体 078 型被发现在动物中大量存在（特别是仔猪和小牛），从而被认定为人畜共患病原[195-196]。医生必须知道他们当地艰难梭菌的情况，必须了解高毒株在社区是否传播，因为这样才能给患者做风险评估，并加强感染控制措施。艰难梭菌调查明显发现每个地区都有它独特的菌株型别，欧洲不同国家菌株的核糖体型不同，甚至同一个州不同地区也不同[193,197-198]。

为解决地方性疾病的情况、监测感染的传播及评估关联菌株的遗传相关性，都需要成功培养出艰难梭菌。为了能如此分析，从纯培养开始要用到很多方法。限制性核酸内切酶分析（restriction endonuclease analysis，REA）、PFGE、PCR 核糖体分型（PCR ribotyping）、多位点序列分型（multilocus sequence typing，MLST）和全基因组测序是流行病学研究中最普遍使用的方法[142,191,199-201]。举例来说，最早流行的北美高毒株 PCR 核糖体分型是 027 型，毒素 A 和 B 基因 PaLoc 分型为Ⅲ型，PFGE 型为 NAP1 型，REA 分型为 BⅠ型[62-63]。这些方法已在其他地方进行了综述[191]，这里简单讨论这些方法，每种方法都有不同的优缺点。很多工具（Simpson

差异指数、Rand 系数和 Wallace 系数）被用来评估不同分型方法结果的一致性[201-202]。总的来说，麻烦又耗时的限制性消化的方法正逐步被 PCR 和测序的方法取代。用 DNA 限制性内切酶 Hind Ⅲ消化全基因组 DNA 来分析艰难梭菌是早期用来描述菌株特征的分子方法之一[199,203]。十年间许多研究都认为它是一个敏感性高、鉴别能力强、可重复的方法[201,203]。目前，几乎没有实验室用这个方法来对艰难梭菌分型，可能因为操作和结果解释比较复杂[191]。

在北美洲，PFGE 是描述艰难梭菌菌株特征的主要方法。Sma Ⅰ是最常用的低频剪切限制性酶。虽然这个方法有极好的鉴别能力，但它操作麻烦，费用昂贵，还可能产生不同于已知的 NAP 型的条带[191,202,204]。

全球都在使用 PCR 核糖体分型确定艰难梭菌流行病学，该方法已成为欧洲的参考方法[191,204-205]。PCR 核糖体分型是用两对特异性引物扩增 16S 和 23S rRNA 中间的间隔区。间隔区相对于它们高度保守的 rRNA 基因来说具有多样性特征。艰难梭菌有 10 个 rRNA 拷贝，不但不同菌株之间，而且同一株菌不同 rRNA 拷贝之间的间隔区都存在变异。基于凝胶的 PCR 核糖体分型已被更好的标准化毛细管电泳取代[204-205]。WEBRIBO 网站（https://webribo.ages.at/）可免费自动分析和比较基于毛细管测序仪的艰难梭菌 PCR 核糖体分型数据，简化实验室 PCR 核糖体分型方法。毛细管电泳-PCR 核糖体分型没有 PFGE 和 REA 那么复杂，多个实验室间一致性好[191,201,204]。目前已有 900 多个核糖体型。类似于荷兰的做法，英国的健康保护局建立了艰难梭菌核糖体分型网作为加强全国监测计划的一部分[206]。以 ECDC 作为协调员和 CE-PCR 核糖体分型作为标准分型方法，现已在欧洲多个国家建立了国家 CDI 监测计划[198]。预期的艰难梭菌分型结果可以了解地区性和全国性流行的艰难梭菌核糖体型和它们相关的并发症发生率，尤其是高毒性的核糖体 027 型和 078 型[198,206]。相信可以利用这些数据加强感染控制和临床干预。

MLST 同时要求对几个管家基因进行局部扩增和测序。MLST 和其他基于序列的方法所产生的数据比基于片段的方法更明确，实验室间更容易比较[191,201]。MLST 方法的费用比 PCR 方法要高。核基因组多位点序列分型基于 WGS 获得的数据，并且比 MLST 具有更高的分辨率。而且，它等同于基于单核苷酸多态性的检测方法，对艰难梭菌分型具有很大潜力。法国生物梅里埃股份有限公司和德国 Ridom Seqsphere 公司（bioMérieux, Marcy l' Étoile, France, and Ridom Seqsphere, Münster, Germany）一直在开发可商用的系统，目前正在进行临床验证。

几个研究组采用 WGS 解释高致病性克隆，比如核糖体 027 型和 078 型的进化史[68,195]。下一代的测序平台使得研究室可以在常规流行病调查中利用快速的全基因组数据。下一代的测序可以替代现有的方法，为传统分型方法不能发现的菌种间差异提供其他的解决方法，而且费用逐渐下降[68,72,207]。WGS 的应用表明，农民和猪具有相同的艰难梭菌 078 型菌株，说明种群之间有传播[196]。

MLST 作为可重复和高分辨力的方法成功用于临床和食品中肉毒梭菌 A 型[208]、肉鸡群坏死性肠炎暴发中的产气荚膜梭菌[209]和饲养的家禽发生坏疽性皮炎中分离到的败毒梭菌[210]的分型。Leclair 等[211]描述了一种改良的 PFGE 方法，对四起肉毒中毒暴发相关的临床和食品分离株分型，与随机扩增多态性 DNA 分析和自动核糖体分型比较，该方法是肉毒梭菌 E 型菌株流行病学相关性分型最有效的方法。此外，基因组可变串联重复数目分析（variable numbers of tandem repeat, VNTR），称为多位点 VNTR 分析，可以用于产气荚膜梭菌[212]。以前用 PFGE 进行过分型的流行病学相关菌株也重新用多位点 VNTR 分型，发现两者结果非常一致。Macdonald 等[97]阐述了肉毒梭菌的 VNTR 区域，为肉毒中毒暴发事件调查时区别肉毒梭菌 BoNT 和 A1 菌株提供了快速和高分辨力的工具。

九、血清学试验

尽管有许多市售的抗血清用于艰难梭菌鉴定，血清学程序对于菌落的确切鉴定是不实用的。而且，没有标准化的试验可以用于检测临床标本中梭菌抗体从而确诊梭菌感染。为了评估接种的状况，测定抗破伤风毒素的免疫球蛋白 G 抗体是很有用的，但是当免疫状况不清楚的情况下，就必须预防性接种。

十、抗菌药物敏感性

表55-4中总结了一些梭菌种菌株的抗菌药物敏感性研究。两篇新的参考文献阐述了检测厌氧菌的基础方法[213-214]。既然更多的实验室用MALDI-TOF MS鉴别厌氧菌,就会有更多准确的菌种和更可信的敏感性数据产生。过去,厌氧菌的药物敏感性表现出可预测的模式,可以安全地进行经验性治疗,但是最近在世界范围内,已观察到对几种重要药物(β-内酰胺类、甲硝唑和克林霉素)的耐药性稳定且明显地增加。因此,用于患者治疗或监测目的的厌氧菌抗菌药物敏感性试验至关重要[213,215]。另外,因为厌氧菌敏感性研究本身操作困难,发展出了新的表型方法和分子技术[213,215]。

一些药物缺乏对不同梭菌的抗菌活性,包括甲氧苄啶-磺胺甲噁唑、氨苄西林和氯林可霉素。梭菌对氨苄西林/舒巴坦或者哌拉西林/他唑巴坦不耐药,梭菌对亚胺培南、甲硝唑和万古霉素耐药也不常见。5种梭菌(菌株数都很少)和产气荚膜梭菌对关注的抗菌药物几乎不耐药(表55-4)。对亚胺培南、甲硝唑和万古霉素这三种药物耐药的细菌包括多枝梭菌、无害梭菌和梭形梭菌。

很多研究表明梭菌对多种抗生素耐药。青霉素耐药尤其常见于多枝梭菌、梭形梭菌和丁酸梭菌;这些菌种产生由β-内酰胺抗生素诱导的β-内酰胺酶。第三梭菌有特殊的耐药特性,包括对β-内酰胺抗生素、甲硝唑和氯林可霉素耐药。当用甲硝唑治疗CDI时,必须考虑到由于药物本身的前药性质,使用相当长的时间后才会显现抗生素活性。已证实有耐氯林可霉素菌株的有产气荚膜梭菌(如上所述)、多枝梭菌、艰难梭菌、第三梭菌、近端梭菌、丁酸梭菌、产胞梭菌和无害梭菌。艰难梭菌的药敏试验开展得越来越多,特别是自从新的药物频繁引入后。来自欧洲、美国和澳大利亚的监测研究表明,没有非达霉素耐药证据,对甲硝唑敏感性降低也罕见[216-218]。在欧洲和美国,对利福平、莫西沙星和克林霉素耐药在多种核糖体型中很明显,但在澳大利亚却没有。无法解释的观察结果是39.1%的核糖体027型美国分离株对万古霉素敏感性降低[217]。

新西兰进行的一项大规模调查研究显示,在15年的时间里,临床分离株对氯霉素、哌拉西林、甲硝唑、亚胺培南,以及β-内酰胺类/β-内酰胺酶抑制剂(如氨苄西林/舒巴坦)的复合药物的敏感性均无显著变化[219]。Finegold等[220]2009年的研究表明,与新霉素、利福昔明、替考拉宁和万古霉素比较,氨苄西林/舒巴坦和硝唑尼特的效果最好。梭菌对头孢菌素类和四环素类有不同程度的耐药,它们通常对氨基糖苷类耐药。除了产气荚膜梭菌外,很多梭菌(尤其是多枝梭菌、梭形梭菌和无害梭菌)对头孢西丁、头孢噻肟、头孢他啶、头孢唑肟、头孢哌酮和其他广谱β-内酰胺类抗生素都耐药[159]。大多数无害梭菌菌株对万古霉素仅为中度敏感[220-221]。

早期的喹诺酮类,如环丙沙星、左氧氟沙星和洛美沙星对厌氧菌活性不高。一些较新的喹诺酮类,如莫西沙星、加替沙星和加雷沙星,在体外对包括梭菌在内的大多数厌氧菌最初活性都很高,但在欧洲这种状况很快就发生了变化[216,222]。欧洲和美国艰难梭菌分离株中莫西沙星耐药已很常见,但在澳大利亚并不常见[216-218]。

十一、结果的评估、解释和报告

从临床标本甚至血培养中分离到的梭菌菌株可能并没有明确的临床意义,培养结果与患者临床表现的相关性需要分析。患者自身肠道菌群的梭菌芽胞可能附着于皮肤上,可能污染血液标本或者其他标本。菌血症可能是一过性的或者没有临床意义。此外,偶尔会出现在伤口处、分泌液、血液和其他正常无菌体液中的大多数梭菌菌株是条件致病菌,不会导致严重的或进行性疾病,除非宿主体内有合适的生长条件。正如前面所讨论的,败毒梭菌就是一个例外,它几乎不会在血培养中检出,除非患者有潜在的恶性肿瘤或者伴中性粒细胞减少的败血症。败毒梭菌败血症是一种突发急性传染病,需要实验室和临床医生之间迅速、清晰地沟通交流,以便尽早采取手术措施和开始抗生素治疗来改善预后。第三梭菌、产气荚膜梭菌和其他梭菌较少与需要应急处置的严重感染相关。为了避免发生严重后果,最好的方法是微生物学家和临床医生之间进行良好沟通。

准确、及时的初步检测结果(如临床标本的直接镜检,阳性血培养直接进行MALDI-TOF MS分析)和早期培养的结果(培养的24h和48h)对

表 55-4 不同药物对梭菌的活性(Wadsworth 琼脂稀释法)[a]

抗生素	CLSI MIC 折点(μg/ml)		敏感率(%)																	
	敏感	中介	双酶梭菌	鲍尔特梭菌	丁酸梭菌	尸毒梭菌	梭形梭菌	艰难梭菌	双胞梭菌	乙二醇梭菌	哈氏梭菌	无害梭菌	类腐败梭菌	产气荚膜梭菌	多枝梭菌	败毒梭菌	索氏梭菌	产芽胞梭菌	近端梭菌	破伤风梭菌
青霉素/氨苄西林[b]	≤0.5	1	100	32	86	100	24	0	100	100	7	100	94	100	100	100	100	100	100	0
氨苄西林/舒巴坦	≤8/4	16/8	100	10	100	ND	ND	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
哌拉西林/他唑巴坦	≤32/4	64/4	100	100	ND	ND	ND	100	ND	ND	100	100	ND	100	100	100	100	100	ND	100
头孢西丁	≤16	32	ND	90	100	ND	81	0	ND	ND	98	ND	ND	100	ND	ND	ND	ND	ND	83
克林霉素	≤2	4	100	90	100	100	91	5	100	92	88	83	87	96	82	100	94	8	85	0
亚胺培南	≤4	8	100	100	100	100	100	20	ND	ND	100	100	100	100	100	ND	100	100	ND	100
甲硝唑	≤8	16	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98	100	100	98	100	95	100	100	100
莫西沙星	≤2	4	ND	ND	ND	ND	0	78	ND	ND	9	ND	ND	99	ND	ND	ND	ND	ND	ND

注：[a] 数据源于参考文献[8][214][219][223-224]。ND. 无数据。[b]产 β-内酰胺酶的菌株可认定为耐药

于内科医生来说非常有价值。一些梭菌(如产气荚膜梭菌、索氏梭菌和产孢梭菌)可能具有独特的菌落和镜检特征,因此可在全部检测完成前给出初步的或者推测性的报告。MALDI-TOF MS的应用大大缩短了鉴定时间。为了更好地阐明梭菌在疾病中的作用,协助临床医生选择合适的治疗,以及基于公共卫生的需要,准确和明确的鉴定非常必要(例如院内获得性艰难梭菌疾病)。

由梭菌及其毒素导致的危及生命的疾病,如肉毒毒素中毒、破伤风或者严重的艰难梭菌感染病例,应该由临床医生和微生物学家一起认真地审查,确保进行了适当的标本采集、运送和即时处理,并给予特异性治疗。此外,医疗卫生机构也需要准确和快速的诊断,以便在疾病可能暴发前进行预警,从而采取有效的控制措施。

参考文献请扫二维码查阅

第56章 拟杆菌属、卟啉单胞菌属、普雷沃菌属、梭杆菌属和其他厌氧革兰阴性杆菌

GEORG CONRADS, ELISABETH NAGY, EIJA KÖNÖNEN

（戴媛媛 译；刘根焰、苏建荣 审校）

一、分类及概述

大多数临床相关的不形成芽胞的严格厌氧革兰阴性杆菌属于拟杆菌门（Bacteroidetes），拟杆菌目（*Bacteroidales*），包括拟杆菌科（*Bacteroidaceae*）、卟啉单胞菌科（*Porphyromonadaceae*）、普雷沃菌科（*Prevotellaceae*）和理研菌科（*Rikenellaceae*）；梭杆菌门（*Fusobacteria*），梭杆菌目（*Fusobacteriales*），包括梭杆菌科（*Fusobacteriaceae*）和纤毛菌科（*Leptotrichiaceae*）。此外，临床重要的不形成芽胞的厌氧革兰阴性杆菌还可存在于一些其他细菌门，例如硬壁菌（*Firmicutes*）、变形菌（*Proteobacteria*）和互养菌（*Synergistetes*）。目前本章所涉的菌种在分类学上有了很大的变化，命名了一些新的菌属，过去几年又描述了几个新的菌种。表56-1总结了2014年以来命名上发生的变化。表56-2是临床标本中分离的厌氧革兰阴性菌的特征，具体总结如下。

表56-1 人源性标本中分离的不形成芽胞的革兰阴性厌氧杆菌最新属和种的分类及重分类（2014年至今）

门和属	新菌属	菌种	以前的名称	参考文献
拟杆菌门				
另枝菌属		"伊氏另枝菌（*A. ihumii*）"	尚未验证	12
		狭边另枝菌（*A. inops*）	新种	10
丁酸单胞菌属（*Butyricimonas*）	是	人屎丁酸单胞菌	新种	33
		副毒丁酸单胞菌 *B. paravirosa*	新种	33
		菲西丁酸单胞菌 *B. phoceensis*	新种	34
粪杆菌属		第二粪杆菌属	新种	10
副拟杆菌属		粪副拟杆菌	新种	27
卟啉单胞菌属		"支气管卟啉单胞菌"	尚未验证	19
		巴斯特卟啉单胞菌（*P. pasteri*）	新种	20
		波戈纳卟啉单胞菌（*P. pogonae*）	新种	21，22
普雷沃菌属		有色普雷沃菌（*P. colorans*）	新种	51
梭杆菌门				
梭杆菌属		"哈娃苏科梭杆菌（*F. hwasookii*）"	尚未验证	57
互养菌门				
稀有杆菌属（*Rarimicrobium*）	是	人稀有杆菌（*R. hominis*）	新种	66
木质素杆菌属（*Cloacibacillus*）		埃氏木质素杆菌（*C. evryensis*）	*Synergistes* sp.	67
		豪猪木质素杆菌（*C. porcorum*）	*Synergistes* sp.	67

表 56-2 临床标本中常见的革兰阴性厌氧杆菌代表菌属的特征[a]

菌属	微需氧环境生长	细胞形态	动力	色素[i]	20%胆汁生长	药物敏感性[j]：万古霉素(5 μg)	卡那霉素(1000 μg)	黏菌素(10 μg)	过氧化氢酶	吲哚	硝酸盐还原	糖发酵	主要代谢终产物[k]	代表性菌种
拟杆菌属[b]	－	短	－	－	＋	R	R	R	－	V	－	＋	A,SA	脆弱拟杆菌
另枝菌属[c]	－	短	V	V	V	R	R	R	V	V	－	V	A,SA	腐败另枝菌
臭气杆菌属[d]	－	多形性	－	－	V	R	R	R	V	＋	－	V	A,P,SA	内脏臭气杆菌
卟啉单胞菌属[e]	－	V	－	＋	－	S	R	R	V	V	－	V	A,B,P	不解糖卟啉单胞菌
丁酸单胞菌属	－	球杆状	－	－	－	S[f]	R[f]	R[f]	V	＋	－	＋	B,IB,IV,A,P,SA	协同丁酸单胞菌
副拟杆菌属	－	短	－	－	＋	R	R	R	V	－	－	＋	A,SA	狄氏副拟杆菌
坦纳菌属	－	多形性	－	－	－	R	S	S	V	－	－	－	A, B, IV, P,PA	福赛斯坦纳菌
普雷沃菌属	－	球杆状	－	V	－	R	V	V	－	V	－	＋	A,SA	产黑色普雷沃菌
梭杆菌属	－	V	－	－	V	R	S	S	－	V	－	V	B	具核梭杆菌
纤毛菌属/斯尼思菌属[g]	－	V	－	－	－	V	S	S	V	－	－	＋	L	口腔纤毛菌
戴阿李斯特菌属	V	球菌	－	－	－	R	S	V	－	－	－	－	A,P	侵肺戴阿李斯特菌
月形单胞菌属	－	弯曲	＋	－	－	R	S	V	－	－	＋	＋	A,P	生痰月形单胞菌
萨特菌属	V	直	－	－	V	R	S	S	－	－	V	－	SA	沃兹沃思萨特菌
嗜胆菌属	－	直	－	－	＋	R	S	S	＋	－	＋	－	A	沃兹沃思嗜胆菌
脱硫弧菌属[h]	－	弯曲	＋	＋	V	R	S	R	V	－	V	－	A	脱硫脱硫弧菌
厌氧螺菌属	－	螺旋,长	＋	－	V	R	S	V	－	－	－	＋	A,SA	产琥珀酸厌氧螺菌

注：[a]＋. 阳性；－. 阴性；V. 可变。[b]狭义上的拟杆菌属。[c]塞内加尔另枝菌可以在微需氧环境生长，"肥胖另枝菌"有动力，而腐败另枝菌不分解糖。[d]羊毛臭气杆菌的敏感性模式未见报道。[e]卡托卟啉单胞菌不产色素，对万古霉素耐药，不产生丁酸。本诺卟啉单胞菌能产生琥珀酸但不产生丁酸或丙酸。[f]从人类标本中分离的菲西丁酸单胞菌和有毒丁酸单胞菌数据中推断。[g]某些菌株再次培养时能在微需氧环境中生长；羊水斯尼思菌对万古霉素敏感。[h]懒惰脱硫弧菌无动力。[i]在血平板上可产生从黄褐色到黑色色素；有时需要培养 2 周才能产生色素；兔血琼脂可提高色素产量。[j]菌种鉴定药物纸片；R. 耐药；S. 敏感；V. 可变；抑菌圈直径>10 mm 为敏感。[k]A. 乙酸；B. 丁酸；IB. 异丁酸；IV. 异戊酸；P. 丙酸；PA. 苯乙酸；SA. 琥珀酸

在拟杆菌科内，拟杆菌属是由分解糖、耐胆汁的不产色素的菌种组成，它们主要分离于肠道[1]。目前，该菌属主要限于脆弱拟杆菌群，含50多个菌种，其中一半以上的菌种可从人类标本分离[2]（菌种更新可见 http://www.bacterio.net）。这些菌种，尤其是脆弱拟杆菌、多形拟杆菌和卵形拟杆菌（*B. ovatus*）与人类感染高度相关[3-6]。

另枝菌属（*Alistipes*）属于理研菌科，目前包括7个已公布的菌种：芬戈尔德另枝菌（*A. finegoldii*）、难辨另枝菌（*A. indistinctus*）、狭边另枝菌（*A. inops*）、翁德顿另枝菌（*A. onderdonkii*）、腐败另枝菌（*A. putredinis*）、沙阿另枝菌（*A. shahii*）和蒂莫内另枝菌（*A. timonensis*）[7-10]。此外，还发现了一些新的另枝菌种[11-13]。总之，另枝菌种为厌氧，无动力（肥胖另枝菌除外），除难辨另枝菌为球形，其他菌种皆为直的或稍微弯曲的杆菌。该菌属大多数菌种能产生色素，弱分解糖[除不解糖的腐败另枝菌和狭边另枝菌（*A. inops*）]，对胆汁耐受能力可变。

卟啉单胞菌科（*Porphyromonadaceae*）有7个菌属的菌种可从人类标本中检出：巴恩斯菌属（*Barnesiella*）、丁酸单胞菌属（*Butyricimonas*）、粪杆菌属（*Coprobacter*）、臭气杆菌属（*Odoribacter*）、副拟杆菌属（*Parabacteroides*）、卟啉单胞菌属（*Porphyromonas*）和坦纳菌属（*Tannerella*）。其中，卟啉单胞菌属与临床最相关。目前，卟啉单胞菌属已报道了19个临床相关的菌种，其中许多是动物源性细菌。不解糖卟啉单胞菌（*P. asaccharolytica*）、本诺卟啉单胞菌（*P. bennonis*）、卡托卟啉单胞菌（*P. catoniae*）、牙髓卟啉单胞菌（*P. endodontalis*）、牙龈卟啉单胞菌（*P. gingivalis*）、索氏卟啉单胞菌（*P. somerae*）和上野卟啉单胞菌（*P. uenonis*）是人类标本中最常见的菌种[14-18]。新发现的人源菌种“支气管卟啉单胞菌（*P. bronchialis*）”分离自一位患有非小细胞肺癌的老年患者支气管液[19]；巴斯德卟啉单胞菌（*P. pasteri*）分离自人唾液[20]；波戈纳卟啉单胞菌（*P. pogonae*）已从蜥蜴及人的急性鼻窦炎、软组织感染和血液标本中分离到[21-23]。大多数种类都是不酵解糖、产色素的，但越来越多的种类，包括本诺卟啉单胞菌、卡托卟啉单胞菌及新的种巴斯德卟啉单胞菌、波戈纳卟啉单胞菌和“支气管卟啉单胞菌（*P. bronchialis*）”都不产色素。人源性的副拟杆菌属（*Parabacteroides*）包含3种前拟杆菌属菌种：狄氏副拟杆菌（*P. distasonis*）、古氏副拟杆菌（*P. goldsteinii*）和屎副拟杆菌（*P. merdae*），还有戈登副拟杆菌（*P. gordonii*）和约氏副拟杆菌（*P. johnsonii*）[24-26]，以及从人类粪便中分离的新物种粪副拟杆菌（*P. faecis*）[27]。副拟杆菌属的细菌分解糖，对20%的胆汁耐受。该菌属在进化关系上很接近坦纳菌属[28]和巴恩斯菌属[29]。坦纳菌属只有一个菌种：福赛斯坦纳菌（*T. forsythia*）（以前命名为 *T. forsythensis*）[28]，该菌是重要的口腔病原菌；巴恩斯菌属有一个人源性菌种：人肠道巴恩斯菌（*B. intestinihominis*），该菌分离自粪便[30]。上述两种细菌都是厌氧、不产色素、无动力、形态多样的杆菌。丁酸单胞菌属包含3个新的菌种：人屎丁酸单胞菌（*B. faecihominis*）、副维罗萨丁酸单胞菌（*B. paravirosa*）和来自人类粪便的“菲西丁酸单胞菌（*B. phoceensis*）”。有毒丁酸单胞菌（*B. virosa*）最初从鼠粪中分离，最近从几例菌血症患者的血液中分离出来[31-35]。从婴儿粪便中分离的无动力革兰阴性杆菌苛求粪杆菌（*Coprobacter fastidiosus*）及从粪便中分离的新发现的菌种塞氏粪杆菌（*C. secundus*）的粪杆菌属（*Coprobacter*）为无动力革兰阴性杆菌，与巴恩斯菌属最为相近[36]，但目前尚未见有临床意义的报道。臭气杆菌属包含两种人源性菌种：内脏臭气杆菌（*O. splanchnicus*）（以前归类为拟杆菌属）和羊毛臭气杆菌（*O. laneus*）；以及一种犬源性菌种犬齿臭气杆菌（*O. denticanis*）[7,37]。内脏臭气杆菌可分解糖，对胆汁耐受，而羊毛臭气杆菌不分解糖，对20%胆汁敏感。

普雷沃菌科包含一些能分解糖或中度分解糖的短杆菌，其发酵产生的主要终产物为乙酸和丁二酸[38]。过去数年，该科细菌新增了大量菌种。大多数普雷沃菌分离于口腔[39-43]，也可分离于粪便[44]及身体其他部位，这些部位可与各种临床状况相关[45-50]。最近发现的新物种是有色普雷沃菌（*P. colorans*），分离自人的伤口感染标本[51]。解肝素普雷沃菌（*P. heparinolytica*）和动胶普雷沃菌（*P. zoogleoformans*）主要分离于感染的猫和犬咬伤伤口，与普雷沃菌科其他菌种的关系较远，在系统进化树上反而与拟杆菌属菌种关系较近。最近提出了一个与普雷沃菌相近的新菌属拟普雷沃菌属（*Alloprevotella*）[52]；该菌属包含以前的坦纳普

雷沃菌(*Prevotella tannerae*)[现重新归类为坦纳拟普雷沃菌(*A. tannerae*)]及一个新的菌种灰色拟普雷沃菌(*A. rava*)。另一个与普雷沃菌属较远的菌属副普雷沃菌属(*Paraprevotella*)由亮白副普雷沃菌(*P. clara*)和嗜木糖副普雷沃菌(*P. xylaniphila*)组成,这两个菌种分离于人类粪便[53]。

拟杆菌门的居福西亚菌属(*Phocaeicola*)仅包括一个种(动力阳性),即脓肿居福西亚菌(*Phocaeicola abscessus*),分离自脑脓肿标本,但尚未确定其属于哪一个科[54]。

梭杆菌门的梭杆菌科中,与临床相关的菌属有梭杆菌属(*Fusobacterium*)、纤毛菌属(*Leptotrichia*)和斯尼思菌属(*Sneathia*)。这些微生物为无动力、多形的杆菌,主要分离自口腔和女性生殖道。在一个测定梭杆菌属菌种的 16S~23S rRNA 基因转录间区序列的研究中[55],发现形成了三个种系簇。第一簇包括死亡梭杆菌(*F. mortiferum*)、可变梭杆菌(*F. varium*)和溃疡梭杆菌(*F. ulcerans*)(均来自口腔以外且耐受胆汁)。第二簇包括具核梭杆菌(*F. nucleatum*)亚种、舟形梭杆菌(*F. naviforme*)(注:不同实验室获得的舟形梭杆菌菌株的表型和基因型有显著不同;Conrads 等在本研究中使用的菌株符合该物种的原始描述[55])、猴梭杆菌(*F. simiae*)和牙周梭杆菌(*F. periodonticum*)(均来自口腔)。第三簇包含坏死梭杆菌(*F. necrophorum*)亚种和微生子梭杆菌(*F. gonidiaforman*)(均具有侵袭潜能)。鲁斯梭杆菌(*F. russii*)和极臭梭杆菌(*F. perfoetens*)形成独立的分支。梭杆菌门细菌在分类上的模糊,尤其是高度异源性的具核梭杆菌,可用牙周生物被膜中口腔细菌间紧密的相互作用而发生的基因水平转移进行解释[56]。"哈娃苏科梭杆菌(*F. hwasookii*)"是一种从牙周病中分离出来的新的口腔菌种,但需等待认可[57]。纤毛菌属是由无动力、高度分解糖、产生乳酸的长杆菌构成。该菌属目前有 7 个已确认的菌种:口腔纤毛菌(*L. buccalis*)、古德费诺纤毛菌(*L. goodfellowii*)、香港纤毛菌(*L. hongkongensis*)、霍夫斯德纤毛菌(*L. hofstadii*)、沙阿纤毛菌(*L. shahii*)、特雷维桑纤毛菌(*L. trevisanii*)和韦德纤毛菌(*L. wadei*)[58-60]。从动物体液分离到的一个尚未公布的新菌种"羊水纤毛菌(*L. amnionii*)"[61],它在系统发生上与需血斯尼思菌(*Sneathia sanguinegens*)[以前为需血纤毛菌(*Leptotrichia sanguinegens*)]的关系比其他纤毛菌属细菌的关系更近[62]。最近描述了一株从阴道分离的、表型特征典型、系统发生上与羊水纤毛菌类似的菌株,从而提出了一个新的菌种羊水斯尼思菌(*Sneathia amnii*)[62]。

在互养菌门中,至今仅从人类标本分离到少数几个可培养的菌种:苛求依赖杆菌(*Fretibacterium fastidiosum*)[63]、人荣凯菌(*Jonquetella anthropi*)[64]和鱼腥味锥形杆菌(*Pyramidobacter piscolens*)[65],以及新的菌种人稀有杆菌(*Rarimicrobium hominis*)[66-67]。此外,两种木质素杆菌(*Cloacibacillus*)[埃氏木质素杆菌(*C. evryensis*)和豪猪木质素杆菌(*C. porcorum*)]最初分别从厌氧污泥消化池和猪盲肠分离,最近从人类标本中分离出[67]。它们是专性厌氧、无动力、革兰阴性细菌。荧光原位杂交试验揭示口腔含有许多不同的不能培养的互养菌,呈大弯曲的杆菌[68],广泛分布于健康人及患者的各个生态系统[68-69]。

在革兰阳性的硬壁菌门中,Negativicutes 纲含有一些具备传统的革兰阴性菌细胞壁结构的细菌[70],包括临床上重要的属,如戴阿李斯特菌属(*Dialister*)、巨单胞菌属(*Megamonas*)、月形单胞菌属(*Selenomonas*)和百足菌属(*Centipeda*)。戴阿李斯特菌属含有 5 个人源性菌种:浑浊戴阿李斯特菌(*D. invisus*)[71]和分离于口腔的侵肺戴阿李斯特菌(*D. pneumosintes*)[以前为侵肺拟杆菌(*Bacteroides pneumosintes*)],分离于临床标本的微嗜氧戴阿李斯特菌(*D. micraerophilus*)和产丙酸戴阿李斯特菌(*D. propionicifaciens*)[72],以及分离于粪便的喜琥珀酸戴阿李斯特菌(*D. succinatiphilus*)[30]。这些厌氧或微需氧的革兰阴性球杆菌不分解糖,对大多数生物化学试验不反应[72]。巨单胞菌属的两个人源性菌种超巨巨单胞菌(*M. hypermegale*)和线状巨单胞菌(*M. funiformis*)[73]为厌氧革兰阴性大杆菌。月形单胞菌属中蛛形月形单胞菌(*S. artemidis*)、黛安娜月形单胞菌(*S. dianae*)、福氏月形单胞菌(*S. flueggei*)、不幸月形单胞菌(*S. infelix*)、有害月形单胞菌(*S. noxia*)和生痰月形单胞菌(*S. sputigena*),以及密切相关的牙周百足菌(*Centipeda periodontii*)也可从人类口腔分离[74]。它们是厌氧、革兰阴性、弯曲的有动力的杆菌。最近从人类粪便分离到两种严格厌氧的无动力的革兰阴性长杆菌,它们被归

为氨基酸球菌科(Acidaminococcaceae)[75]中一个新的菌种;琥珀酸考拉杆菌(*Phascolarctobacterium succinatutens*)。从人类粪便分离到的微小克里斯滕森菌为具备革兰阴性细胞壁的厌氧短杆菌[76]。系统发生上,它属于硬壁菌门中的一个新的菌科克里斯滕森菌科(Christensenellaceae)。

变形菌门各科都包含对人类临床重要的菌属和菌种。最近将萨特菌属(*Sutterella*)和副萨特菌属(*Parasutterella*)归于一个新的菌科萨特菌科[77]。它们由一些不分解糖、耐胆汁的革兰阴性短杆菌或球杆菌组成,其中沃氏萨特菌(*S. wadsworthensis*)、小红萨特菌(*S. parvirubra*)、人粪副萨特菌(*P. excrementihominis*)和第二副萨特菌(*P. secunda*)[77]可从人类标本中分离。脱硫弧菌科(*Desulfovibrionaceae*)包含两个有临床意义的菌属:嗜胆菌属(*Bilophila*)和脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)。沃氏嗜胆菌(*Bilophila wadsworthia*)为厌氧、不分解糖、耐胆汁的革兰阴性杆菌,是人类重要的致病菌[78]。脱硫弧菌属有70多种细菌,其中仅少数不常见的细菌可引起人类感染[79]。脱硫弧菌科中,脱硫微菌属(*Desulfomicrobium*)只有一个人类菌种,即口腔脱硫微菌(*D. orale*),它与牙周疾病相关[80]。在琥珀酸弧菌科(Succinivibrionaceae)中,厌氧螺菌属(*Anaerobiospirillum*)有两个菌种,产琥珀酸厌氧螺菌(*A. succiniciproducens*)和托马斯厌氧螺菌(*A. thomasii*),它们可从人类、猫和犬的粪便中分离到[81]。琥珀酸单胞菌属(*Succinatimonas*)只有一个分离于人类粪便的菌种——希佩琥珀酸单胞菌(*S. hippie*)[82]。最后一种细菌是无动力、非螺旋、无鞭毛的细菌。厌氧螺菌属、脱硫弧菌[除懒惰脱硫弧菌(*D. piger*)外]和脱硫微菌属为有动力、可还原硫酸盐的螺旋形细菌。

自2002年起,基因工程已经测定了大量的各种革兰阴性厌氧菌的全基因组,目前已经包括了本章讨论的几乎所有菌属的成员。读者可登录NCBI主页(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/)获取详细的信息。有趣的是,具核梭杆菌的基因组序列显示:该菌具备革兰阴性菌的细胞壁,包括外膜,但该菌还有相当比例的基因与硬壁菌门中的革兰阳性菌同源,提示梭杆菌属有革兰阳性菌起源[83]。

目前分类学研究常用的方法主要基于核酸分析,特别是16S rRNA基因测序及序列比较,以揭示分类群的系统发育关系。引入多位点序列分型、平均核苷酸鉴定分析和基因组间距离分析,可补充甚至取代DNA-DNA杂交对细菌种水平的鉴定。这些方法不必与目前临床微生物实验室广泛使用的表型特征相对应,如菌细胞和菌落的形态学、培养环境的要求及各种生化试验的结果。不过,所有分离株都应当选择恰当的培养环境,因为真正的厌氧菌可通过细菌对培养环境中出现的氧敏感性及对甲硝唑的敏感性而与兼性厌氧菌区分[84]。表56-2总结了革兰阴性厌氧杆菌中临床相关菌属的特征性差异。

自本手册前一版编制以来,通过培养学的方法从不同部位的临床标本中分离出了许多候选菌种;例如伊胡拟杆菌(*Bacteroides ihuae*)、地中海拟杆菌(*B. mediterraneensis*)、新生拟杆菌(*B. neonati*)和蒂莫内拟杆菌(*B. timonensis*);马赛加蓬杆菌(*Gabonibacter massiliensis*);马赛马赛普雷沃菌(*Massiliprevotella massiliensis*),伊胡普雷沃菌(*Prevotella ihumii*)和风毛菊普雷沃菌(*P. phocaeensis*);马赛梭杆菌(*Fusobacterium massiliense*);风毛菊假解黄酮菌(*Pseudoflavonifrator phocaeensis*);马赛达克拉菌(*Dakarella massiliensis*);马赛麦赫拉菌(*Mailhella massiliensis*);马赛萨特菌(*Sutterella massiliensis*)和蒂莫内特菌(*S. timonensis*)。大多数病例是基于一株分离菌,且在其名称被批准和(或)其临床意义被证实之前,我们(本章的作者和编辑们)决定本书不包括这些菌种。然而,毫无疑问,正如我们从名言"伟大的平板,计的数太偏"中所知道的那样,还有许多新菌种被排除在外[85]。

二、流行病学和传播

革兰阴性厌氧杆菌定植于人或动物的口腔和胃肠道的黏膜表面。婴儿口腔和肠道的厌氧菌主要来自母亲,是多种共生菌同时定植而成,如产黑色普雷沃菌(*Prevotella melaninogenica*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)或脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)[86-88]。其中某些微生物,如梭杆菌和普雷沃菌,在口腔广泛存在,从生命早期牙萌出时即成为牙生物被膜的一部分[86,89]。此外,还发现普雷沃菌是其他寄生部位的优势菌,如食管、胃和

肺[90-92]，以前认为这些部位仅定植了非常有限的微生物。在肠道，拟杆菌属细菌在婴儿早期就成为其微生物群的一部分[88]，剖宫产延迟脆弱拟杆菌群细菌在婴儿肠道内的定植时间，并大大降低细菌的定植水平[93]。此外，定植的拟杆菌属的菌种构成也会因喂养乳汁的类型而异[94]。肠道以硬壁菌和拟杆菌两个菌门的细菌为主。肠道菌群构成成分的改变可影响肠道的屏障功能，从而影响宿主的生理、能量平衡（肥胖风险），或黏膜免疫系统。此情况下，革兰阴性厌氧菌起关键作用[2,95]。女性生殖道内，当阴道内产生过氧化氢的乳杆菌数量降低时，某些普雷沃菌种增加，成为阴道相关其他的微生物菌群的重要组成部分[96-97]。值得注意的是，有相当比例的细菌仍然无法培养，所以不同身体部位的微生物菌群仍未有很明确的定义[69,98-100]。

一个重要的观点是，由于地理位置和种族的差异，微生物菌群也有很大差异。这种差异明显影响到了不同人群中疾病相关微生物的分离率[97,101-103]。

三、临床意义

厌氧菌主要来源于内源性微生物菌群，一般从多种细菌混合感染中检出，其感染部位位于厌氧菌定植部位附近的黏膜表面。大多数感染是因为基础疾病或手术创伤导致厌氧菌定植的黏膜或管腔的完整性遭到破坏所致。生物被膜相关感染，如牙周炎和细菌性阴道病，是由于感染部位生物被膜中某些具有毒力的细菌富集在牙龈下或阴道内，导致局部微生物菌群生态失调所致[97]。但是内源性感染不包括被人类口腔微生物群污染抓握伤以及动物和人咬伤。革兰阴性厌氧菌，如脆弱拟杆菌，涉及各种感染类型，发病率和病死率都较高[2]。表 56-3 总结了临床标本中经常分离出革兰阴性厌氧菌的感染部位。厌氧菌时常能扩散到邻近组织和血液中，后果严重。牙槽局部感染可导致口腔厌氧菌沿头颈部组织间隙扩散至纵隔，危及生命[104]。当革兰阴性厌氧菌进入血液并引发全身炎症反应时，可能导致脓毒症或感染性心内膜炎，后果可致命。胃肠道和口咽部是革兰阴性厌氧菌血流感染细菌入血常见的部位，胃肠道手术和肿瘤基础疾病是主要诱因[105-107]。在口腔，当进行日常的口腔卫生和咀嚼食物时，大量的口腔厌氧菌可以通过发炎的牙周组织进入血液[108-109]。上述事实让人们认识到预防口腔感染的重要性，尤其是对感染性心内膜炎高危患者。

表 56-3 人源性标本能经常检测到的革兰阴性厌氧杆菌菌属

菌株分离的部位和（或）感染类型或条件[a]	分离的菌属[b]
脑和（或）CNS	拟杆菌属，戴阿李斯特菌属，梭杆菌属，卟啉单胞菌属
口腔	
脓肿	戴阿李斯特菌属，梭杆菌属，普雷沃菌属，卟啉单胞菌属
牙髓感染	百足菌属，戴阿李斯特菌属，梭杆菌属，卟啉单胞菌属，普雷沃菌属，坦纳菌属
牙周感染	脱硫微菌属，戴阿李斯特菌属，梭杆菌属，卟啉单胞菌属，普雷沃菌属，月形单胞菌属，坦纳菌属
植入物周围感染	梭杆菌属，卟啉单胞菌属，普雷沃菌属，坦纳菌属
牙源扩散性感染	梭杆菌属，普雷沃菌属
耳、鼻、喉	梭杆菌属，普雷沃菌属，卟啉单胞菌属，坦纳菌属
下呼吸道	拟杆菌属，戴阿李斯特菌属，梭杆菌属，卟啉单胞菌属，普雷沃菌属，月形单胞菌属
腹部/小肠	
脓肿	另枝菌属，拟杆菌属，嗜胆菌属，梭杆菌属，副拟杆菌属，卟啉单胞菌属，萨特菌属
阑尾炎	另枝菌属，拟杆菌属，嗜胆菌属，梭杆菌属，副拟杆菌属，卟啉单胞菌属，萨特菌属
腹膜炎	另枝菌属，拟杆菌属，脱硫弧菌属，副拟杆菌属，卟啉单胞菌属，萨特菌属
腹泻	厌氧螺菌属，拟杆菌属
泌尿生殖道	
脓肿	拟杆菌属，普雷沃菌属
细菌性阴道病	纤毛菌属，卟啉单胞菌属，普雷沃菌属，斯尼思菌属，坦纳菌属

（续 表）

菌株分离的部位和(或)感染类型或条件[a]	分离的菌属[b]
羊膜腔感染	戴阿李斯特菌属，梭杆菌属，纤毛菌属，卟啉单胞菌属，斯尼思菌属
早产	梭杆菌属，纤毛菌属，斯尼思菌属
尿路感染	拟杆菌属，戴阿李斯特菌属，纤毛菌属，普雷沃菌属
皮肤软组织感染	
脓肿	拟杆菌属，戴阿李斯特菌属，梭杆菌属，莱凯菌属，卟啉单胞菌属，普雷沃菌属
溃疡/慢性伤口	拟杆菌属，戴阿李斯特菌属，卟啉单胞菌属，普雷沃菌属
咬伤感染(动物)	拟杆菌属，梭杆菌属，卟啉单胞菌属，普雷沃菌属
咬伤感染(人)	戴阿李斯特菌属，梭杆菌属，普雷沃菌属
骨和关节	
关节炎	拟杆菌属，卟啉单胞菌属，坦纳菌属
骨髓炎	拟杆菌属，梭杆菌属，卟啉单胞菌属
心血管	
菌血症	另枝菌属，厌氧螺菌属，拟杆菌属，嗜胆菌属，脱硫弧菌属，戴阿李斯特菌属，梭杆菌属，纤毛菌属，副拟杆菌属，卟啉单胞菌属，普雷沃菌属，斯尼思菌属
心内膜炎	拟杆菌属，梭杆菌属，纤毛菌属
心包炎	拟杆菌属，梭杆菌属

注：[a] CNS. 中枢神经系统；[b]按字母顺序排列，顺序与分离率无关

(一)拟杆菌属及其相关菌属

临床标本中的厌氧菌，耐胆汁的脆弱拟杆菌比其他厌氧菌更常见，毒力更强，对抗菌药物更耐药。尽管肠道内其他种类的拟杆菌属细菌的数量是脆弱拟杆菌的10～100倍，但实际上血液、溃疡、脓肿、支气管分泌物、骨、腹腔内感染、阑尾及脑部标本中脆弱拟杆菌是最常分离的厌氧菌[2]。在拥有超过3000份临床标本的Wadsworth Anaerobe Collection数据库中，多形拟杆菌（*B. thetaiotaomicron*）和卵形拟杆菌（*B. ovatus*）也能在这些标本中检出，但检出率较低。美国的一个大样本系列研究收集并分析了1997－2007年从临床标本中分离到的6500株脆弱拟杆菌菌群后，也证实了这一点：脆弱拟杆菌最常见（51%），其次为多形拟杆菌（19%）和卵形拟杆菌（10%）[110]。比利时一家医院对2004－2013年厌氧菌菌血症的研究发现这三种细菌的分离率相似[111]。大多数分离株来自血液和腹腔感染。儿童中，脆弱拟杆菌是腹腔内感染分离的主要病原菌[2,112]；如它可从急性阑尾炎患者几乎所有组织标本中分离到[113]。脆弱拟杆菌10%～20%的菌株可产生由*bft1-3*基因编码的肠毒素；已经证明这些菌株与儿童和成人腹泻有关。此外，血培养分离株中，它们的比例似乎要比非产毒株高[114]。脆弱拟杆菌群细菌（这里包括狄氏副拟杆菌）和其他拟杆菌属菌种是厌氧菌血流感染中最常见的病原菌[2,105-107,115]。加拿大Alberta省在人群中进行了一个9年的回顾性厌氧菌血流感染分析，发现904例中有277例（31%）为脆弱拟杆菌群细菌[107]。并发症，尤其是结直肠癌并发症，为厌氧菌菌血症常见的危险因素。此外，新型拟杆菌属菌种多尔拟杆菌（*B. dorei*）、类拟杆菌（*B. faecis*）、芬戈尔德拟杆菌（*B. finegoldii*）和诺德拟杆菌（*B. nordii*）也有从血液分离的报道[115-117]。

拟杆菌相关的心内膜炎（这种感染中胃肠道来源的脆弱拟杆菌最常见）中，该细菌引起的心内膜炎比其他厌氧菌引起的感染更严重，也更致命[118]。脆弱拟杆菌群细菌常从心包炎患者的标本中分离到[119]，也常从脓毒性关节炎和骨髓炎患者分离到[120]，分离菌落常为单个菌落。尽管由厌氧菌引起的椎间盘炎不常见，但小肠源性菌血症的病例中需要考虑脆弱拟杆菌感染的可能[121]。腹膜透析的患者很少发生厌氧菌性腹膜炎；然而，还是能从这些患者中分离到脆弱拟杆菌和多形拟杆菌[122]。脆弱拟杆菌群细菌和其他拟杆菌属细菌可以通过血源性播散到达脑部，引起脑脓肿[123-125]。此外，本群细菌是烧伤感染分离到的优

势菌，此时，它们还可能引起脓毒症[126]。拟杆菌属细菌也会引起部分混合性坏死性软组织感染[2]，且脆弱拟杆菌群细菌是除革兰阳性厌氧菌外，中重型糖尿病足中最常分离到的厌氧菌[127-128]。许多新型拟杆菌属细菌，如粪拟杆菌(*B. faecis*)、马赛拟杆菌(*B. massiliensis*)、诺德拟杆菌和萨耶斯拟杆菌(*B. salyersae*)也已经从各种临床标本中检出[116-117]。猫犬咬伤的感染标本中，可以发现化脓拟杆菌(*B. pyogenes*)/隐蔽拟杆菌(*B. tectum*)[129-130]，但最近报道了一例无动物咬伤史的患者感染化脓拟杆菌导致的肝脓肿并继发菌血症[131]。

产生色素、耐胆汁的另枝菌属菌种[芬戈尔德另枝菌(*A. finegoldii*)、翁德顿另枝菌(*A. onderdonki*)和沙阿另枝菌(*A. shahii*)]与儿童和成人的阑尾炎密切相关[9,113]。此外，所有上述 3 种细菌，尤其是翁德顿另枝菌已经从腹腔液中检出，翁德顿另枝菌还从腹腔脓肿和尿中检出[9,115,132]。据报道，有 2 个病例都从血液中检出了芬戈尔德另枝菌[113]；通过系统进化分析，其中 1 例细菌被鉴定为翁德顿另枝菌[132]。

(二)卟啉单胞菌及相关菌属

卟啉单胞菌属菌种的致病能力因种而异。在 4 种口腔卟啉单胞菌属菌种中，牙髓卟啉单胞菌(*P. endodontalis*)和牙龈卟啉单胞菌为已知的病原菌。牙龈卟啉单胞菌为主要的牙周病原菌之一，它的检出率随着年龄的增长而增加[134-135]。除可从牙周炎病例检出外，它还常从坏死溃疡性牙龈炎、感染性牙根管、周围植入性损伤、急性根尖周脓肿等疾病的口腔标本中检出[102,136-137]。除口腔外，还可从身体其他部位的临床标本检出卟啉单胞菌属菌种。例如：腹腔[138]、细菌性阴道病的阴道[139]、羊水[140]、风湿性关节炎和银屑病关节炎患者的滑液[141]；还可从血栓闭塞性脉管炎患者堵塞的下肢动脉中检出该菌及其他一些牙周微生物[142]。牙髓卟啉单胞菌是根管感染和急性牙周脓肿的优势菌之一[100,136,143]，还有可能是慢性牙周炎的病原菌[144]。上野卟啉单胞菌(*P. uenonis*)表型特征与牙髓卟啉单胞菌和不解糖卟啉单胞菌类似，可从腰部以下的混合感染中检出：如阑尾炎、腹膜炎、藏毛脓肿、骶骨褥疮感染及细菌性阴道病[14,145]。

不解糖卟啉单胞菌和索氏卟啉单胞菌可从中重度糖尿病足部感染分离[127]。VA Wadsworth 医学中心实验室从各种标本分离到 58 株索氏卟啉单胞菌，这些标本来自下肢皮肤、软组织或骨骼，特别是腹股沟或骶部脓肿、腹腔脓肿、气管抽吸液、腋窝脓肿、乳突炎、血培养、脑组织和感染的头皮(上述疾病是按其分离到索氏卟啉单胞菌的频率排列)[16]。本诺卟啉单胞菌可从感染性伤口和脓肿标本分离，尤其是直肠周围、臀部和腹股沟的皮肤和软组织慢性损伤组织标本[17]。尽管至今在口腔定植的卡托卟啉单胞菌未与任何疾病相关，但还是从一腹部脓肿分离到该菌[15]。“支气管卟啉单胞菌(*P. bronchialis*)”是从一名患有非小细胞性肺癌的老年患者的支气管灌洗液中分离出来的新型菌种[19]。动物来源的卟啉单胞菌属[如犬齿龈液卟啉单胞菌(*P. cangingivalis*)、犬嘴卟啉单胞菌(*P. canoris*)、犬口腔卟啉单胞菌(*P. cansulci*)、格鲁卟啉单胞菌(*P. gulae*)(与牙龈炎卟啉单胞菌类似)，猕猴卟啉单胞菌(*P. macacae*)和波戈纳卟啉单胞菌(*P. pogonae*)]在人群也有分离，大部分病例都是来自动物咬伤后感染标本[22,23,130]。

副拟杆菌属(*Parabacteroides*)菌种是人肠道常见的定植菌，狄氏副拟杆菌是腹腔感染和阑尾炎标本中分离的重要厌氧菌之一，从上述标本还能检出古氏副拟杆菌和屎副拟杆菌(*P. merdae*)[2,146]。此外，从人血中能检出狄氏副拟杆菌、屎副拟杆菌、古氏副拟杆菌和戈登副拟杆菌[2,26,115,147-148]。

福赛斯坦纳菌是牙周炎主要的病原菌之一[134,149]。此外，它还是根管感染的优势菌之一[102,143]，也可从种植牙周围检出[137]。此外，还能从成人扁桃体隐窝分离到大量的福赛斯坦纳菌[99]。喉头切除后行声带修复术的患者，福赛斯坦纳菌是在人工声带上形成生物被膜的主要厌氧菌之一[150]。该菌也能从细菌性阴道病患者的阴道标本[139]、类风湿关节炎和银屑病关节炎患者的滑液标本检出[141]。

(三)普雷沃菌及其相关菌属

普雷沃菌是口腔主要病原菌，尽管是共生菌，但其参与了几乎所有类型的口腔感染。有趣的是，产黑色普雷沃菌是唾液中常见的厌氧菌[86]，它

与具核梭杆菌、中间普雷沃菌和颊普雷沃菌都是人咬伤感染常见的厌氧菌之一[151]。致龋微生物群主要由革兰阳性菌组成，但某些水解蛋白的革兰阴性菌，包括栖牙普雷沃菌（*P. denticola*）和坦纳普雷沃菌（*P. tannerae*）[目前命名为坦纳拟普雷沃菌（*Alloprevotella tannerae*）]也经常能在高度龋损伤组织中检出[152]。中间普雷沃菌（*P. intermedia*）与慢性和侵袭性牙周炎高度相关[101,135]，中间普雷沃菌和（或）具典型表型特征的变黑普雷沃菌（*P. nigrescens*）也可从下列标本中检出：妊娠期龈炎、坏死溃疡性龈炎、牙周炎、种植牙周炎、根管感染和牙槽脓肿[102,136-138,153]。此外，巴隆普雷沃菌（*Prevotella baroniae*）已证实是根管感染和急性牙脓肿抽吸液常见的厌氧菌[102,143]。中间普雷沃菌被认为是坏疽性口炎（cancrum oris）最重要的微生物[154-155]。在扩散性牙源性感染中，普雷沃菌属中的细菌似乎发挥重要作用，其中颊普雷沃菌（*P. buccae*）和口腔普雷沃菌（*P. oris*）的作用最为突出[104,156]。最近发现产黑色普雷沃菌（*P. melaninogenica*）/栖组织普雷沃菌（*P. histicola*）与成人复发性扁桃体炎显著相关[99]。

最近提出了一个囊性纤维化患者混合性细菌感染的新概念，在这些患者的痰标本中不仅检出了需氧的铜绿假单胞菌或金黄色葡萄球菌，还检出了一些厌氧菌，尤其是普雷沃菌属的细菌，例如产黑色普雷沃菌、栖牙普雷沃菌、口腔普雷沃菌和唾液普雷沃菌（*P. salivae*），上述细菌是这些患者痰中持续的优势菌[157]。此外，普雷沃菌群细菌还可从呼吸机相关性肺炎患者的支气管肺泡灌洗液中分离到[158]。而且，还在许多口腔外感染和身体各部位的脓肿中发现了多种普雷沃菌。例如：在女性生殖道分离到羊水普雷沃菌（*P. amnii*）、二路普雷沃菌（*P. bivia*）、人体普雷沃菌（*P. corporis*）、双向普雷沃菌（*P. disiens*）、中间普雷沃菌、变黑普雷沃菌和蒂莫内普雷沃菌（*P. timonensis*）[49,97,139]；尿中分离到口腔普雷沃菌（*P. buccalis*）[159]；在皮肤和软组织感染，包括糖尿病足病变可分离到卑尔根普雷沃菌（*P. bergensis*）、二路普雷沃菌和产黑色普雷沃菌[46,127]；可从腹腔和软组织脓肿分离到中间普雷沃菌和变黑普雷沃菌[138]；从扁桃体周围和咽喉壁脓肿分离到中间普雷沃菌（在广义方面）和产黑色普雷沃菌；从乳腺脓肿中分离到蒂莫内普雷沃菌（*P. timonensis*）[47]；从关节炎患者的关节滑液中分离到中间普雷沃菌[141]；从血栓闭塞性脉管炎患者闭塞的下肢动脉分离到中间普雷沃菌和变黑普雷沃菌（常与其他的牙周膜细菌一起分离到）[142]。最近新描述的从多细菌感染的伤口标本中分离的有色普雷沃菌（*P. colorans*）[51]。还可从血流感染患者分离到数种普雷沃菌属厌氧菌，如二路普雷沃菌、颊普雷沃菌、栖牙普雷沃菌、双向普雷沃菌和变黑普雷沃菌[115,138]。解肝素普雷沃菌是比较常见的从动物咬伤伤口标本分离到的厌氧菌[130]。随着测序技术的广泛使用，专性厌氧革兰阴性杆菌越来越多地在临床标本中检出，例如脑或肝脓肿，普雷沃菌属和梭杆菌属都名列前茅[160-161]。

脓肿普雷沃菌（*P. abscessus*）分离自人类脑脓肿标本，最近在原发性牙髓感染标本中也可检出[54,162]。

（四）梭杆菌属及其相关菌属

临床上，最重要的梭杆菌属细菌为具核梭杆菌和坏死梭杆菌（*F. necrophorum*）[163-165]。在过去数年，人们对梭杆菌属细菌在人类感染中所起的作用越来越感兴趣，尤其是复发性扁桃体炎、咽峡后脓毒症（Lemierre 综合征）、脑脓肿和菌血症[99,161,166-170]，但也可在非典型感染的患者中分离到，如急性阑尾炎、炎性肠病和结肠癌[171-173]。此外，对于儿童，因存在侵袭性感染风险，耳源性的梭杆菌感染需高度重视[174-175]。

具核梭杆菌是口腔厌氧菌，该菌可分为数个具有不同致病能力的亚种。它还是牙周袋致病生物被膜形成关键微生物，也是种植体周围组织炎、牙根管感染、牙槽脓肿和播散性牙源性感染中重要的病原菌[102,137,143,156]。研究发现，具核梭杆菌是扁桃体隐窝的优势菌[99]，也是人工声带细菌生物被膜的主要细菌，导致人工声带因此而需要更换[150]。它还是引起除口腔外一系列部位感染和身体各部位脓肿的重要致病因子，它可从血液、脑、胸、心脏、肺、肝、阑尾、关节、长骨、腹部、肠道、泌尿生殖道、胎膜和人咬伤感染等组织中分离[113,115,119-120,123,151,159,164,166,169-171,173,176-180]。具核梭杆菌菌血症常伴有基础并发症[166,169-170]。医院感染性具核梭杆菌菌血症与病死率增加相关[170]。回顾一家三级医院 1991—2000 年所有脑

脓肿病例的资料显示：40%的脑穿刺标本仅有厌氧菌生长；其中，具核梭杆菌最常见，每 3 例诊断清楚的病例中就有 1 例分离到该菌[123]。另一个用分子生物学方法进行细菌检测的研究中，在 51 例脑脓肿标本中，特别是鼻窦炎或牙病治疗后患者的标本中，具核梭杆菌（*F. nucleatum*）最常见[176]。最近，挪威在五所大学医院进行了为期两年的多中心研究，在 20 个厌氧菌的脑脓肿中，有 19 个发现了梭杆菌，主要是具核梭杆菌[161]。梭杆菌属的黏附素 A 可将口腔梭杆菌[具核梭杆菌（*F. nucleatum*），牙周梭杆菌（*F. periodonticum*）和猴梭杆菌（*F. simiae*）]与非口腔梭杆菌[包括微生子梭杆菌（*F. gonidiaformans*）、死亡梭杆菌、鲁斯梭杆菌和溃疡梭杆菌]区分开[181]。该研究报道，一株分离自阴道的菌株 DUMC CF 108-1，被当作“舟形梭杆菌（*F. naviforme*）”，它不表达黏附素 A。然而，舟形梭杆菌最初分离自头部病变，并与口腔梭杆菌群聚在一起[55]。由于黏附素存在于从宫内感染中分离出来的具核梭杆菌中，但在阴道标本中分离的微生子梭杆菌中却不存在，因此推测宫内具核梭杆菌起源于口腔而不是阴道。一项新的观察显示，结肠癌肿瘤组织中具有大量具核梭杆菌，而且它还与淋巴结转移呈正相关[172]。

2 个坏死梭杆菌的亚种中，坏死梭杆菌香肠形亚种（biovar B）为人类优势分离株，而坏死梭杆菌坏死亚种在动物中更常见[163,165]。重要的毒力因子如白细胞毒素和血纤维蛋白溶酶原结合毒力因子可解释坏死梭杆菌的侵袭性[182]。坏死梭杆菌以与 Lemierre 综合征相关而著名，该综合征被认为是侵袭性坏死梭杆菌病，常累及肺胸膜，见于健康的青少年和年轻人[163,165,167-168,183]。值得注意的是，感染坏死梭杆菌的侵袭性疾病可能在增多[163]。在丹麦，主要源于口咽部的 Lemierre 综合征的青少年病死率为 9%，在有基础疾病的老年人中，源于下半身的播散性坏死梭杆菌感染的病死率为 26%[183]。后一种类型的病例中，还应考虑基础癌症。有趣的是，青少年中约 10%非 A 群链球菌引起的扁桃体炎（持续性咽痛）中可分离到坏死梭杆菌[163,165,184]。丹麦 2001—2006 年对 847 例扁桃体周脓肿患者进行的回顾性研究发现：23%的脓液抽吸液或拭子中检出了坏死梭杆菌，其中大多数标本呈纯菌生长[185]。另一项丹麦的研究显示，在 2007 年至 2009 年由全科医生从 15－24 岁的患者中采集的 1930 份咽拭子中，发现坏死梭杆菌的检出率是 22%[186]。坏死梭杆菌可引起多种感染，在头颈部，如扁桃体炎、扁桃体周脓肿、深颈间隙感染、纵隔炎、耳源性感染、乳突炎、鼻窦炎及牙源性感染；颅内感染并发症：静脉窦血栓形成、大脑脓肿和脑膜炎；系统性表现：菌血症、败血症、胸膜肺感染、骨和关节感染、软组织感染、腹腔内脓毒症、心内膜炎和心包炎等[165-169,174-175,185,187]。

其他梭杆菌属细菌，如坏疽梭杆菌（*F. necrogenes*）、溃疡梭杆菌和死亡梭杆菌-可变梭杆菌群也可从临床标本分离[112,127,164,174,188]。动物来源的具核梭杆菌和具核梭杆菌样细菌、猫狗梭杆菌（*F. canifelinum*）和鲁斯梭杆菌是猫犬咬伤的重要病原菌[130,189]。最近，从一名与猫有密切接触的患者的前脚掌深部溃疡中分离出鲁斯梭杆菌，但除了一些划痕外，该患者否认有任何咬伤[190]，且在人类口腔中检测到猫狗梭杆菌序列[191]。

口腔或胃肠道黏膜损伤的免疫缺陷患者厌氧菌性菌血症中越来越多涉及共生性的纤毛菌属细菌，但也常是免疫缺陷患者菌血症和感染性心内膜炎的病原菌[59,105,192-195]。口腔纤毛菌（*L. buccalis*）、古德费诺纤毛菌、特雷维桑纤毛菌和韦德纤毛菌是血液标本中主要检出的纤毛菌属细菌。美国犹他州国家参考实验室对近 5 年纤毛菌属细菌的分析发现，在 68 例纤毛菌阳性培养中特雷维桑纤毛菌占 75%，古德费诺纤毛菌、韦德纤毛菌和新发现的香港纤毛菌各占 9%，口腔纤毛菌占 1.5%[193]。有趣的是，香港纤毛菌主要发现于多发性骨髓瘤患者。在一位免疫力正常的患者中，发现韦德纤毛菌（*L. wadei*）是导致重症肺炎的致病菌[196]。有报道称女性生殖道感染性疾病，包括细菌性阴道病、宫内死胎和流产感染与羊水纤毛菌（*L. amnionii*）（目前为羊水斯尼思菌）相关[61,97,145,177,197]。事实上，该菌与用于临床诊断细菌性阴道病的 Amsel 的四个标准（pH、胺臭味试验、阴道分泌物、索状细胞）都显著相关[97]。此外，也曾报道数个与分娩相关的菌血症的病例[198]，其中 1 例为新生儿脑膜炎[199]。也曾从 1 例男性关节标本中分离到该菌[200]，提示该菌并不严格局限于女性生殖道。基于接受肾移植的患者尿标本中高浓度的羊水纤毛菌，也认为该菌是尿路感染的病原菌[159]。在 1 例免疫正常妇女

患者的关节炎标本中检出了一种与需血斯尼思菌最为相近的斯尼思菌属细菌[201]。尽管需血斯尼思菌最初是从血液中分离,但主要却来自各种女性生殖道感染,如早产、新生儿脓毒症、产后菌血症、输卵管积脓及与各种临床症状相关的羊水中[145,177,180,198,202]。最近开展的一项采用16S rRNA分析试验鉴定736例美国弗吉尼亚州城市门诊患者的阴道标本中,斯尼思菌的结果显示:依所选丰度门阈值的不同,有30%~43%的标本可检出靶细菌[62]。研究显示羊水斯尼思菌(*S. amnii*)能够黏附宫颈上皮细胞,并可能侵入子宫腔。纤毛菌/斯尼思菌可被看作临床相关羊膜内病原菌[177-178],它们在早产中的作用可能被低估。

(五)其他革兰阴性厌氧杆菌

互养菌门是一个新的菌门,该门有6个可培养的菌种分属5个菌属:苛求依赖杆菌(*F. fastidiosum*)、人荣凯菌(*Jonquetella anthropi*)、鱼腥味锥形杆菌(*P. piscolens*)、最近新发现的人稀有杆菌(*Rarimicrobium hominis*)[66]、埃氏木质素杆菌(*Cloacibacillus evryensis*)和豪猪木质素杆菌(*Cloacibacillus porcorum*)已经从人的临床标本分离到[67]。人荣凯菌可从乳房脓肿、盆腔脓肿、皮脂腺囊肿、伤口和腹水标本中分离[64],而在牙周炎、牙根窝和牙源性脓肿患者发现了感染性苛求依赖杆菌和鱼腥味锥形杆菌[63,65,102]。临床分离的人稀有杆菌来自妇科手术材料、颅顶骨内脓肿、骶骨和肛周脓肿标本[66],埃氏木质素杆菌和豪猪木质素杆菌分离自自血液标本[67]。

2个戴阿李斯特菌属菌种即侵肺戴阿李斯特菌和浑浊戴阿李斯特菌为口腔定植菌,它们是牙内和牙周感染及急性牙周脓肿的病原菌[71,102,203-205]。此外,它们还可从血液、脑脓肿、呼吸机相关肺炎和囊性纤维化患者的支气管肺泡灌洗液、尿和人咬伤的伤口等标本分离[108,151,157-159,206-207]。相当部分的侵肺戴阿李斯特菌分离株来源于各种皮肤/软组织感染[206]。患者不良的口腔卫生习惯是某些非口腔疾病(如菌血症和脑脓肿)的易感因素[158,207]。产丙酸戴阿李斯特菌和微嗜氧戴阿李斯特菌非专性厌氧菌主要是从腰部以下部位的一系列临床标本分离[72,97,206]。

月形单胞菌属和牙周百足菌为有动力的口腔微生物,它们是牙生物被膜的构成成分[78,208]。生痰月形单胞菌(*Selenomonas sputigena*)可从坏死溃疡性龈炎、侵袭性牙周炎及急性牙脓肿中分离[101,102],有害月形单胞菌(*Selenomonas noxia*)可从慢性和侵袭性牙周损伤分离[101],牙周百足菌可从牙内感染标本分离[209]。更进一步,已有月形单胞菌引起口腔外感染的报道,包括囊性纤维化和菌血症[157]。

在人类厌氧菌菌血症病例中,偶有考拉杆菌的报道,被鉴定为屎考拉杆菌(动物源性,考拉种)[111]。这些分离菌株可能是琥珀酸考拉杆菌,其特征也是从人类粪便中分离出来[75]。

最近,有首例微小克里斯坦菌(*Christensella minuta*)和脱硫脱硫弧菌(*Desulfovibrio desulfuricans*)在急性阑尾炎患者血流中检出的报道[210]。

沃兹沃思萨特菌(*Sutterella wadsworthensis*)是典型的微需氧菌,但是在系统进化上并不靠近严格的弯曲菌属,该菌可从一系列感染标本分离,比如阑尾炎、腹膜炎和直肠周围脓肿标本[211]。最近,在自闭症儿童的回肠黏膜活检标本检出了萨特菌,但在有胃肠道症状的对照儿童则未检出该菌,提示萨特菌在自闭症儿童的胃肠道紊乱中起着重要作用[212]。

沃兹沃思嗜胆菌(*Bilophila wadsworthia*)是有意义的人病原菌,在恶化的腹腔混合感染标本中的分离率越来越高,尤其是阑尾炎[78]。从儿童坏疽性阑尾炎分离沃兹沃思嗜胆菌的比率比成人更高[113]。此外,可从各种身体部位的脓肿和血液中分离到沃兹沃思嗜胆菌[78,113]。

寄居于人胃肠道的某些厌氧螺菌属和脱硫弧菌在临床标本中罕见;典型病例为免疫缺陷患者菌血症和腹部感染[79,214-216]。在两种厌氧螺菌属的细菌中,产琥珀酸厌氧螺菌与菌血症、腹泻和人工关节感染相关,而托马斯厌氧螺菌被认为是腹泻的可能病原菌,但不是菌血症的病原菌[81,217-219]。大多数腹泻的病例都存在人畜共患病的可能[215]。分离自人类感染的脱硫弧菌属细菌,主要包括脱硫脱硫弧菌(*D. desulfuricans*)、“费菲脱硫弧菌(*D. fairfieldensis*)”、懒惰脱硫弧菌和普通脱硫弧菌(*D. vulgaris*)[79,220-222]。脱硫脱硫弧菌在环境中常见,而费菲脱硫弧菌和懒惰脱硫弧菌目前仅从人类标本检出。首个从人类标本发现的肠道脱硫弧菌(*D. intestinalis*)是从4个日本妇女的阴道标本检出[223]。“费菲脱硫弧菌”为一尚未进行有效描述

的菌种，可从血液分离，也可从各种腹腔内、尿和牙周袋检出[221]。脱硫脱硫弧菌菌血症主要与腹部疾病有关[224-226]。除费韭脱硫弧菌外，一种口腔脱硫微菌属细菌（口腔脱硫微菌）也与牙周炎相关[80]。根据有胃肠道症状的自闭症儿童与其兄弟姐妹和非兄弟姐妹对照的粪便标本进行焦磷酸测序的结果发现，脱硫弧菌与退行性自闭症相关[227]。与产甲烷菌一起，硫酸盐还原剂消耗最终产物 H_2，形成“氢库”，并在厌氧（感染）过程中促进细菌的发酵和生长，已成为一种新的致病理念[103,228]。

四、标本的采集、运输和储存

本手册的第12章和第19章讨论了标本的采集、运输和储存的一般指导原则。适于分离厌氧菌的标本包括无菌采集的血液、组织活检标本、抽吸液（如脑脊液、关节液和脓液）、牙根管渗出液和牙菌斑。合格的呼吸道标本包括支气管镜保护毛刷标本，胸腔/胸膜腔穿刺标本、经皮气管抽吸物和手术或尸检获得的肺组织标本。伤口和溃疡标本应优先通过组织活检、伤口刮除术或抽吸采集。例如，对于糖尿病足溃疡，仔细清洁、清除伤口污染物，然后从含活菌量较多的基底或侵袭性组织的边缘采集标本[127]。临床标本中，通过切除或活检采集的感染性组织通常要比脓液好。当需要采集脓液时，最好使用注射器抽吸至含有氧还原指示剂的转运小瓶（例如：Anaerobe Systems 的产品，Morgan Hill，CA，和 Becton，Dickinson，Sparks，MD）内送检。不应使用抽吸标本的注射器送检标本，因为有发生针刺伤或事故性标本喷出及氧通过塑料注射器扩散的风险[84]。不推荐使用黏膜或皮肤拭子。当怀疑菌血症时，推荐采集 20 ml 血液（至少2份标本）进行培养。厌氧培养非常重要，尤其是在有复杂的基础疾病，而菌血症原发部位又未知的情况下[106]。此外，从进行了腹部或妇科手术、腹腔脓肿、伤口污染、压疮、骨髓炎或扩散性口咽患者采集的血液应当检查厌氧菌。

采集的标本必须在厌氧条件下立刻送检实验室以进行进一步处理[如使用 Anaerobe Systems PRAS 厌氧转运培养基（ATM）AS-911 送检，或 BBL Port-A-Cul 转运培养基，或 BBL Vacutainer 厌氧标本采集器（后者为无培养基系统，尽量减少标本稀释），或使用 AnaeroGRO（Hardy Diagnostics，Santa Maria，CA）]。理想的转运系统是能够维持厌氧微生物的活力，还能抑制需氧菌的过度生长。不过，如果临床标本含有苛氧微生物，则应在 24 h 内送至临床实验室[229]。组织标本最好使用特殊的厌氧转运小瓶或在生成厌氧环境的防气体渗漏的密闭袋转运。采自牙龈下或牙根管的小组织标本和活组织标本可用半固体的转运培养基（如 Anaerobe Systems Becton、Dickinson 及 Hardy Diagnostics 的产品）送检。

关于不同部位采用不同方法及转运系统和厌氧技术的详细指南可见其他章节[84]。

为了长期储存，比如2～3天的陈旧培养物可用含消毒的20%脱脂牛奶的小瓶在－70℃保存。另一种冷冻方法是将 48 h 的肉汤培养物、不含葡萄糖的熟肉培养基与无菌甘油混合，用吸管吸进无菌小瓶。

五、直接检测

通过肉眼、长波长荧光观察标本及标本本身产生的气味可为实验室提供有价值的厌氧菌生长线索。标本中出现由易挥发的短链脂肪酸和胺而形成的恶臭和腐败味，与标本中存在厌氧菌相关。标本中出现黑色的坏死组织和（或）红色的荧光也提示产色素的革兰阴性杆菌的存在[84]。

革兰染色仍然是最简单、最快捷而且最有可能获得有价值信息的检验项目，所有厌氧菌培养标本都应该进行。许多革兰阴性厌氧杆菌都具有独特的细胞形态，如梭杆菌属内不同的菌种。例如：咽痛后败血症患者阳性血培养瓶的革兰染色涂片如发现多形性的革兰阴性杆菌，提示可能是坏死梭杆菌侵袭性感染[163]。应报告涂片中出现的细菌和宿主炎症细胞的形态和相对数量。革兰染色以 Nugent 标准解释阴道分泌物仍是诊断细菌性阴道病最好的方法[96]。然而，核酸扩增试验测定阴道分泌物中正常阴道和细菌性阴道病中菌群相对细菌总数的丰度，可以提供更准确的细菌性阴道病诊断。

分子检测

人们越来越多地采用分子方法直接从临床标本检测细菌或证实鉴定结果。但是，这类方法目

前还主要在专业的口腔和微生物研究实验室应用，但其常规诊断的用途正逐步扩大。

无论是典型的混合菌感染，如牙周炎、牙内感染和播散性牙源性感染[68,100,144,156]，还是通常不考虑但是却有厌氧菌参与的感染，如囊性纤维化等[157]，已成功应用测定16S rRNA基因的全长和部分序列（信息量最大的V3-V6区域）检测其中的苛养菌和可能的病原菌。值得注意的是，培养方法可能低估了临床上存在苛养菌或无法培养的菌种标本。例如，普雷沃菌属细菌在囊性纤维化患者的肺部高度流行[157,230]，但常规的痰培养不进行厌氧菌培养，也不报告可能的厌氧致病菌。此外，在经历早产且羊水培养或PCR检测呈阳性的妇女中，仅通过PCR方法能检出7个种属的厌氧菌，包括需血斯尼思菌和羊水纤毛菌（目前称为羊水斯尼思菌）[177]。最近，一项基于分子和FDA批准试验用由医生或患者采集的拭子能准确诊断阴道炎最常见的细菌、真菌和原生动物的感染[231]。此外，采用16S rRNA法在培养阴性的接受肾移植患者的尿道标本中，检出了一系列细菌，其中包括革兰阴性厌氧菌，如普通拟杆菌（*Bacteroides vulgatus*）、浑浊戴阿李斯特菌、具核梭杆菌、“羊水纤毛菌”、口腔普雷沃菌和栖瘤胃普雷沃菌（*Prevotella ruminicola*）。最近，一项研究采用16S rRNA扩增、克隆和测序技术对51例脑脓肿患者脓液标本进行检测，发现了19份病例有混合菌感染，涉及76种不同的细菌，包括22种不能培养的细菌，其中10种为拟杆菌[176]。最近一项研究，对52个脑脓肿样本（包括自发性脑内脓肿、自发性硬膜下脓肿或术后脓肿）进行大规模平行测序，在可检测的前10种细菌中有梭杆菌和普雷沃菌[161]。焦磷酸测序法的研究结果显示，混合感染中菌种的多态性远比以前的推测高。随着该法价格的降低及新方法的使用，如条码标记和V6标签技术的使用，二代测序技术的运用将扩展到健康和疾病相关的混合厌氧微生物群落或追溯暴发流行史[232-234]。下列因素可造成分子试验结果的改变：细胞壁成分的不同导致溶细胞效果的差异，标本中出现竞争性人类DNA，因不匹配或不易接近模板结合位点而导致的引物不准确，杀菌后残存的细菌DNA，不能检测抗菌药物的敏感性，复杂结果和临床意义的解释[235-236]。

六、菌株分离的程序

除血液和关节液培养外，其他标本进行厌氧培养时，不能仅使用液体培养基[84]。固体选择性和非选择性培养基可以提高效率，节约识别和分离菌落的时间。所用选择性培养基的种类应根据采集部位可能的微生物类型，或咬伤伤口则根据施咬者（人或动物）口腔的微生物群落来确定。应使用新鲜制备或预制备的无菌培养基[84]。不同的培养基支持厌氧菌生长的能力也不同；布氏培养基和专性厌氧培养基（Lab M，Bury，United Kingdom）可能是分离革兰阴性厌氧杆菌最好的基础培养基。特别是专性厌氧培养基，可以提高梭杆菌的生长[163]。在学术中心进行大规模的厌氧细菌学试验时，最好使用两种不同的基础培养基以使分离效果最大化。

培养方法已在本书第19章和第20章详细介绍。分离革兰阴性厌氧杆菌最基础的培养基包括：①非选择性的、营养丰富的、含维生素K_1和溶血素（BA）的布氏基础羊血琼脂平板；②选择性分离拟杆菌和普雷沃菌属的卡那霉素-万古霉素羊血琼脂平板；③对标本来自隔肌以下，推测为脆弱拟杆菌群和嗜胆菌属菌的感染时，可用拟杆菌属胆汁七叶苷（*Bacteroides* bile-esculin，BBE）平板。BBE和卡那霉素-万古霉素羊血也可制成双平板使用。苯乙基乙醇羊血琼脂平板可防止需氧革兰阴性杆菌过度生长及某些梭菌的群集，可在混合感染时使用。检测革兰阴性专性厌氧菌时，在非选择性琼脂平板上贴甲硝唑纸片（5 μg）很有用；不过，该法可能掩盖不常见的甲硝唑耐药菌的生长。

接种后，厌氧平板应立即孵育于36～37℃的厌氧环境，如厌氧袋、厌氧罐或厌氧仓。建立和孵育都可以在厌氧仓内完成。在第一个48 h内，平板不可暴露于空气中以避免损失对氧较为敏感的细菌。厌氧仓的使用有助于在任何必要时进行检查。48 h的孵育期可揭示快速生长菌株的存在，如拟杆菌或梭菌，但推荐初次培养的平板重新孵育5～7天，因为某些菌种，如嗜胆菌属、脱硫弧菌和卟啉单胞菌属不能在较短的时间内检出，至少需要4～5天才能长出[78-79,84]。成功的厌氧菌鉴定和药物敏感试验需要在厌氧仓、厌氧罐或厌氧

袋内维持严格的厌氧环境。频繁使用时，厌氧仓可能难以维持适当的气体条件，因此，应当重复进行质量控制，简单的方法为接种耐氧的产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)菌株，在菌膜上贴一张甲硝唑纸片，抑菌圈＞27 mm 表示厌氧状态良好[237]。

随着人们对厌氧菌作为系统性感染病原菌重要性认知水平的提高，厌氧菌在临床微生物学实验室血液标本中的分离和检出将不断增加。例如，LYTIC 10 厌氧/F BACTEC 培养基(Becton Dickinson)就是一种快速、可靠检测厌氧菌的方法，可提高检测标本中低水平厌氧细菌的能力，如普雷沃菌属和梭杆菌属[108]。另一项研究表明，由一个需氧瓶和一个厌氧瓶组成的一套血培养比两个需氧瓶的血培养具有更高的病原菌培养阳性率[238]。本书第4章提供了有关血液培养系统的更多信息。

七、鉴定

厌氧培养后，记录不同类型菌落的数量。应使用解剖显微镜观察平板以提高检测能力。即使培养7天后，某些菌种，如脱硫弧菌和戴阿李斯特菌仍呈针尖大小的透明菌落，在混合的培养物中很容易被忽略[72,79,220-221]。图56-1显示了一

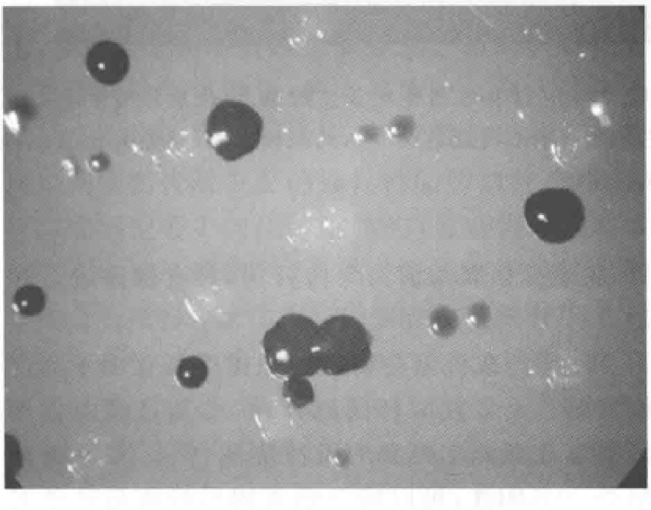


图56-1 与盆腔脓肿相关的可培养微生物的典型菌落。厌氧革兰阴性菌被鉴定为人体普雷沃菌(棕色菌落)、不解糖卟啉单胞菌(黑色菌落)和羊水斯尼思菌(扁平小菌落)。与这种混合感染有关的其他物种是阴道加德纳菌(扁平菌落)和阴道陌生菌(针尖菌落)。在厌氧环境中在血平板上培养72 h，见彩插

例混合培养的例子，标本来自一个放置宫内节育器10年的患者的盆腔脓肿标本。菌落应在血平板上进行传代培养，这时，使用兔血琼脂平板(Kohjin-Bio Ltd.，Japan)可以显示菌落产生的色素，蛋黄琼脂平板可以显示脂肪酶、卵磷脂酶和蛋白水解活性。原始平板需要与分纯和试验平板一起孵育。

(一)推测性鉴定

分纯平板上的菌落形态对推测性鉴定非常有用。例如，平板上具核梭杆菌呈有斑点的、虹彩的或面包屑样的菌落，而沃兹沃思嗜胆菌在BBE平板上为典型的黑色中心菌落[84]。菌落形态加上红细胞凝集能力可在表型上将坏死梭杆菌分成2个亚种[239]。使用人和鸡红细胞的凝集试验程序为：将一滴细菌悬液和一滴红细胞悬液在玻片上混合，然后在显微镜下观察。坏死梭杆菌香肠形亚种(凝集阴性)菌落呈褥垫状、奶油状、闪光菌落，边缘清晰，而坏死梭杆菌坏死亚种(凝集阳性)菌落为凸起、蜡样、阴暗菌落，边缘不整齐。同时，观察溶血具有诊断价值。例如，在马血琼脂平板上，两种坏死梭杆菌亚种均表现为β溶血[239]。人血平板上的溶血特征有助于区分纤毛菌属菌种[58]。

产生色素是推测性鉴定中另一个有价值的可肉眼观察的特征。产色素革兰阴性厌氧杆菌为水解糖和不水解糖的普雷沃菌属和卟啉单胞菌属细菌，以及产生色素的另枝菌属细菌。本文中，需要注意翁德顿另枝菌(*A. onderdonkii*)和沙阿另枝菌(*A. shahii*)"兔血琼脂平板上孵育4天后，菌落呈黑色"的说法是不正确的[9]。正确的表述应为"在兔血琼脂平板上呈轻或中度棕色，在长波长(365 nm)的紫外光下，菌落呈黑色"。观察色素需要新鲜平板，并延长培养时间[132]。在另枝菌属细菌的推测性鉴定中，BBE平板上呈可扩散的棕色色素是新观察到的一个有用的现象[132]。依血液的类型和基础培养基的成分不同，产色素的普雷沃菌属和卟啉单胞菌属细菌产生色素的程度(从米色到黑色，图56-2)和速度(2～21天)有很大不同[84]。长波长紫外光下产生荧光有助于推测性鉴定：典型的产色素的普雷沃菌属和卟啉单胞菌属菌落呈红色(人源牙龈卟啉单胞菌是无荧光的菌种之一)，具核梭杆菌和坏死梭杆菌产黄-绿色荧

光，而脱硫弧菌属和嗜胆菌属细菌，当在挑取菌膜拭子上加1滴2mol/L NaOH测试时，因产生脱硫绿胺霉素色素而呈红色荧光[84,222,239]。图56-3显示了如何用荧光区分一些厌氧菌的菌落的例子。

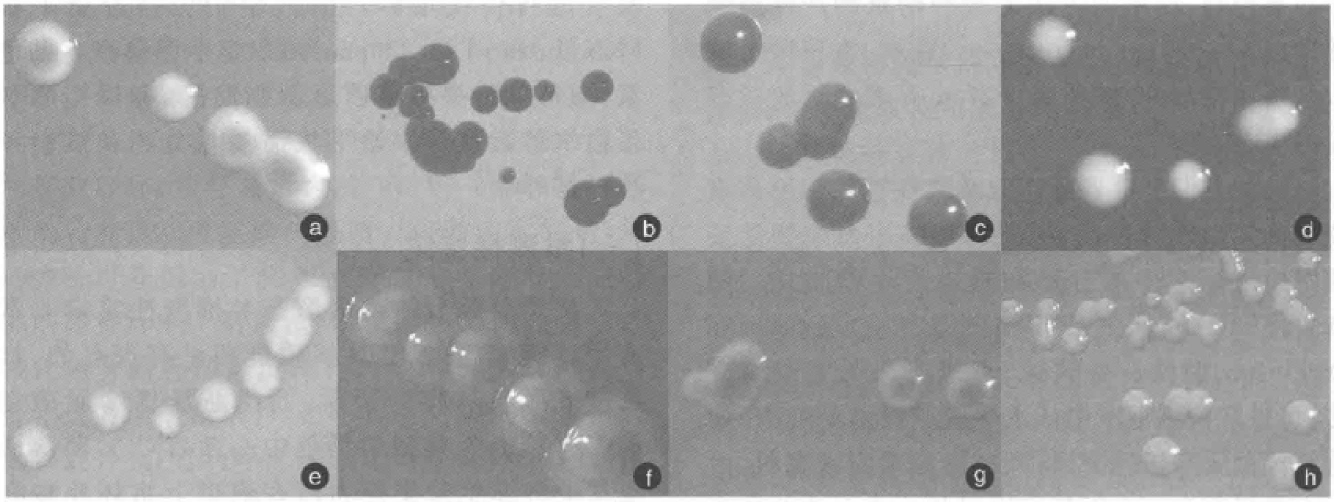


图56-2　普雷沃菌在亲缘关系密切的物种之间的色素变化。第一排：中间普雷沃菌菌群细菌，a. 橘红色普雷沃菌，b. 中间普雷沃菌，c. 变黑普雷沃菌，d. 苍白普雷沃菌；第二排：产黑色普雷沃菌群细菌，e. 栖牙普雷沃菌，f. 空肠普雷沃菌，g. 洛氏普雷沃菌，h. 产黑色普雷沃菌。由Mervi Gürsoy提供，见彩插

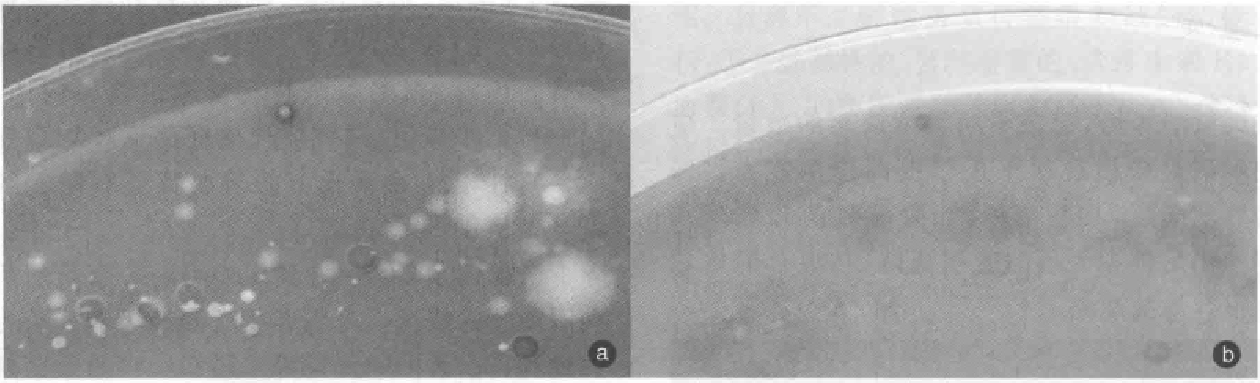


图56-3　a. 利用荧光来区分菌落，如唾液样本（100 ml，稀释10^4倍）接种在哥伦比亚血琼脂上，厌氧环境下培养：产黑色普雷沃菌（菌落带红色荧光）、变黑普雷沃菌（深色的菌落中心有红色荧光），具核梭杆菌（绿色荧光的大菌落）；b. 自然光下的菌落形态。由Laura Wendt提供，见彩插

显微镜下观察细菌革兰染色形态也可辅助细菌鉴定。梭形细菌中，具核梭杆菌常呈长梭形，有锥形末端，而坏死梭杆菌和死亡梭杆菌呈高度多形性，有或无肿胀区及大圆形菌体[8,163,239]。纤毛菌属菌的新鲜培养物常为革兰阳性长杆菌，但该描述仅适合于口腔纤毛菌、霍夫斯德纤毛菌、沙阿纤毛菌和特雷维桑纤毛菌[58,240]。戴阿李斯特菌属为小球杆菌，易与革兰阴性球菌混淆[72]。懒惰脱硫弧菌呈典型双极染色[222]。培养物湿片在显微镜下可观察革兰阴性厌氧菌的动力：月形单胞菌可翻滚运动，常横向穿过视野；厌氧螺菌属菌细胞为螺旋形，具备螺旋状动力；除懒惰脱硫弧菌外，脱硫弧菌属细菌为弯曲杆菌，具有快速进行性动力[79,81,241]。

用胆汁或抗菌药物抑制细菌生长有助于鉴定厌氧菌。大多数拟杆菌属细菌，尤其是脆弱拟杆菌群细菌都具有典型的胆汁抗性[2,84]。根据是否耐受20%胆汁，可以将产色素的另枝菌与产色素的卟啉单胞菌属和普雷沃属细菌区分开[9,242]。梭杆菌中，死亡梭杆菌、可变梭杆菌和坏死梭杆菌的某些菌株可以在含胆汁的平板上生长，而具核梭杆菌则不能生长。对万古霉素（5 μg）、卡那霉素（1000 μg）及黏菌素（10 μg）的特殊效能抗菌药物纸片（抑菌圈直径≥10 mm判为敏感）的敏感性，

可用于许多革兰阴性厌氧菌的推测性鉴定(表56-2)。除产色素的卟啉单胞菌属细菌、丁酸单胞菌属和羊水斯尼思菌外,典型的革兰阴性厌氧杆菌对万古霉素耐药[14,16-17,62,84]。对卡那霉素和黏菌素都耐药是梭杆菌属、纤毛菌属-斯尼思菌属细菌、沃兹沃思萨特菌和福赛斯坦纳菌的特征[72]。与大多数脱硫弧菌属和月形单胞菌属细菌不同,在有动力的革兰阴性杆菌中,厌氧螺菌属通常对黏菌素敏感。

除检测上面所列特征的试验外,大多数临床实验室还可用一些简单的试验。例如,BBE平板上有黑心的耐胆汁菌落如对10%～15% H_2O_2 呈强触酶反应可识别沃兹沃思嗜胆菌[78],结合吲哚和脂酶试验阳性,可将梭杆菌属样的菌落暂时鉴定为坏死梭杆菌[163]。短杆菌,吲哚和脂酶阳性,菌落黑色,有红色荧光可鉴定为中间普雷沃菌/变黑普雷沃菌,而与这些吲哚阳性相似的苍白普雷沃菌(*Prevotella pallens*)则菌落颜色较淡、脂酶阴性[84]。嗜胆菌属和萨特菌属可还原硝酸盐。特征性气味也可指导鉴定:丁酸及其他代谢产物产生的臭味是梭杆菌属细菌的特征,强硫黄味是脱硫弧菌属细菌的典型特征[79,222]。

(二)生化试验

以培养为基础的生化试验中,用于厌氧微生物分类和个别菌种区分的主要技术有糖发酵反应,经预还原而形成的无氧方式灭菌的碳水化合物类或商品化试剂盒,独立的诊断片剂或预制酶试剂盒测定酶特性。此外,气液相色谱法(GLC)测定葡萄糖代谢主要的挥发性脂肪酸终产物,分析细菌细胞壁中的长链脂肪酸,是生化和生理试验有用的辅助诊断[84],但细菌细胞壁中长链脂肪酸的分析试验在大多数临床实验室尚不能开展。

市售的试剂盒,例如API 20A、API ZYM和Rapid ID 32A(bioMérieux, Marcy l'Etoile, France),RapID ANA Ⅱ(Remel, Lenexa, KS)、BBL crystal identification (Becton Dickinson)和AN MicroPlate (Biolog Inc., Hayward, CA)系统可在临床实验室测试预成酶和碳水化合物发酵特征[243]。诊断性片剂(如来自Rosco, Taastrup, Denmark,以及Key Scientific, Stamford, TX)也可用于测定厌氧分离株单个酶反应。上述试验需要从2～3天陈旧培养物制备浓菌悬液,才能获得理想的试验结果。使用不同的试验系统时,试验结果可因底物特性的差异而不同。这些快速、易于使用的试验最适合生长快速、生化反应活跃的厌氧菌,如脆弱拟杆菌群细菌,但即使这些细菌,也不能可靠地鉴定到种的水平。Vitek 2 ANC卡(bioMérieux)是新生产的能自动快速鉴定厌氧菌到种水平的鉴定卡[244-245]。三级医院的临床试验结果显示,Vitek 2 ANC卡可在6 h内快速鉴定常见的临床重要的厌氧菌[245]。鉴定梭杆菌属和普雷沃菌属的成员需要改进[245-246]。目前(2018年7月),该系统的厌氧菌数据库仅包括81种微生物。熟练而准确的革兰染色读片技术可大大提高鉴定准确率[244-245]。

临床标本中最常见的耐胆汁的细菌为脆弱拟杆菌群细菌。血平板上,它们呈灰色、圆形、凸起的完整菌落,此外,它们在BBE平板上生长良好,可水解七叶苷而使琼脂呈黑色[普通拟杆菌(*B. vulgatus*)除外]。基于它们对特殊鉴定纸片(万古霉素、卡那霉素和黏菌素)的耐药性和快速试验的结果,如触酶、吲哚、七叶苷和岩藻糖苷酶,可以初步报告为脆弱拟杆菌群或与此菌群最相近的菌种[84]。测试β-葡糖苷酶可以区分多尔拟杆菌和普通拟杆菌,触酶阴性可以鉴定溶木聚糖拟杆菌[247]。副拟杆菌属包括以前的狄氏副拟杆菌和屎副拟杆菌[24],内脏拟杆菌已归类至臭气杆菌属[37]。此外,临床上相关的菌种包括古氏副拟杆菌和戈登副拟杆菌(表56-4)[24,146,248-249]。所有的副拟杆菌属菌种吲哚和α-岩藻糖苷酶阴性,这个特点可以与脆弱拟杆菌群菌种区分。在进化关系和表型特征上古氏副拟杆菌和屎副拟杆菌非常相似,但古氏副拟杆菌为α-岩藻糖苷酶和β-葡糖苷酶(Rosco)阳性,而屎拟杆菌为阴性[146]。此外,该菌种葡糖醛酸糖苷酶阳性的特点可将它与狄氏副拟杆菌区分。与副拟杆菌属其他菌种不同,戈登副拟杆菌不水解七叶苷,也不发酵海藻糖[26]。大多数脆弱拟杆菌群细菌及相关细菌高度发酵糖类。表56-4为区分脆弱拟杆菌群菌种的关键特征,包括副拟杆菌属和臭气杆菌属。

总的来说,大多数另枝菌属菌种可通过产生的色素与拟杆菌属区分;但该试验要求使用新鲜的兔血琼脂平板,并延长孵育时间[9,132]。该菌属菌种典型特征是不产生色素,但是腐败另枝菌及新描述的菌种"伊氏另枝菌(*Alistipes ihumii*)"

表 56-4 人源性标本分离的脆弱拟杆菌群、臭气杆菌属和副拟杆菌属细菌的鉴定流程[a]

菌种	产生[b]			糖发酵[c]		
	Ind	Cat	α-Fuc	Arab	Tre	Xyl
粪拟杆菌	−	−	+	+	+	+
解纤维素拟杆菌	ND	−	W	W	−	+
光泽拟杆菌[d]	+	−	−	−	W	+
居粪拟杆菌	−	−	+	−	−	+
嗜粪拟杆菌	−	ND	+	−	ND	−
多尔拟杆菌	−	ND	+	+	−	+
埃格拟杆菌	+	−	−	+	−	+
粪类拟杆菌	+	−	+	+	−	+
芬戈尔德拟杆菌	−	ND	−	+	−	+
易死拟杆菌[d]	+	−	+	+	+	+
脆弱拟杆菌	−	+	+	−	−	+
肠道拟杆菌	+	ND	+	+	−	+
马赛拟杆菌	−	−	+	−	−	−
诺德拟杆菌	+	−	−	−	−	+
富油酸拟杆菌[d]	+	+	−	+	+	+
卵形拟杆菌	+	+	+	+	+	+
平常拟杆菌	−	−	+	+	−	+
萨耶斯拟杆菌	+	−	−	+	−	+
粪便拟杆菌	+	V	V	−	−	+
多形拟杆菌	+	+	+	+	+	+
单形拟杆菌	+	−	+	+	−	+
普通拟杆菌	−	−	+	+	−	+
溶木聚糖拟杆菌	−	−	+	+	+	+
羊毛臭气杆菌[d]	+	−	+	−	−	−
内脏臭气杆菌	+	V	+	+	−	−
狄氏副拟杆菌	−	+	−	−	+	+
粪类副拟杆菌	−	+	−	−	+	+
古氏副拟杆菌	−	V	−	−	+	+
戈登副拟杆菌	−	V	−	+	−	+
约氏副拟杆菌	−	+	−	+	+	+
屎副拟杆菌	−	−	−	−	+	+

注：[a]+. 阳性；−. 阴性；V. 可变；W. 弱阳性；ND. 无数据。[b] Cat. 触酶；Ind. 吲哚；α-Fuc. α-岩藻糖苷酶。[c] Arab. 阿拉伯糖；Tre. 海藻糖；Xyl. 木糖。[d] 反应数据是根据单个菌株的试验获取

除外。腐败另枝菌对胆汁敏感，不水解糖[8]，肥胖另枝菌有动力[11]，而塞内加尔另枝菌能在微需氧环境下生长，对甲硝唑耐药[13]。芬戈尔德另枝菌、翁德顿另枝菌和沙阿另枝菌菌株在固体培养基上生长良好，菌落有β溶血；无论是否添加补充剂，很难在液体培养基上生长[9,132]。因在液体培养基中生长不良，它们水解糖的能力差异较大，耐受胆汁，触酶阴性。表 56-5 总结了另枝菌属更多的特征[9]。福赛斯坦纳菌（*T. forsythia*）为牙养口腔病原菌，人源性菌株纯培养需要添加外源性的 *N*-乙酰胞壁酸[28,149]。福赛斯坦纳菌的关键特征为胆汁敏感，色氨酸和七叶苷反应阳性。值得注意的是，来自动物咬伤感染标本的菌株触酶和吲哚阳性[250]。

表 56-5　人源性另枝菌属菌种的表型特征[a]

菌种	产生下列产物						20%胆汁抵抗
	Pigm	Ind	Cat	α-Fuc	β-Glu	β-NAG	
芬戈尔德另枝菌	+	+	−	+	−	+	+
"伊氏另枝菌"[e]	−	−	−	−	+	+	−[d]
难辨另枝菌	+	−	+	+	+	+	−
狭边另枝菌	+	+	−	−	−	−	−
"肥胖另枝菌"[b,e]	+	−	+	−[d]	−	+	−[d]
翁德顿另枝菌	+	+	−	W	V	+	+
腐败另枝菌	−	+	+	−	−	−	−
"塞内加尔另枝菌"[c,e]	+	W	+	−[d]	W[d]	+	−[d]
沙阿另枝菌	+	+	−	+	+	+	+
蒂莫内另枝菌	+	W	+	−[d]	−[d]	W	+

注：[a]+. 阳性 −. 阴性；V. 可变；W. 弱阳性；Pigm. 色素；Ind. 吲哚；Cat. 触酶；α-Fuc. α-岩藻糖苷酶；β-Glu. β-葡糖苷酶；β-NAG. *N*-乙酰-β-氨基葡糖苷酶。[b] 动力。[c] 微需氧并对甲硝唑耐药。[d] 在法国马赛的 PE Fournier 实验室检测，但尚未发表。[e] 已提出，但尚未验证

卟啉单胞菌属菌种中，除卡托卟啉单胞菌(*P. catoniae*)和新描述的巴斯德卟啉单胞菌(*P. pasteri*)、波戈纳卟啉单胞菌(*P. pogonae*)和"支气管卟啉单胞菌(*P. bronchialis*)"外，均产生色素。本诺卟啉单胞菌需要生长 10 天才能显示出微弱的色素。由于色素产生缓慢，生化反应不活泼，鉴定亲缘关系相近且表型特征相似的不解糖卟啉单胞菌、牙髓卟啉单胞菌和上野卟啉单胞菌较为困难。使用预还原、无氧方式灭菌的糖类试验无助于区分上述菌种，但是 AN 微量板系统(Biolog Inc.)中的乙醛酸和甘油能够将上述菌种区分：不解糖卟啉单胞菌为乙醛酸阳性，而上野卟啉单胞菌甘油阳性[14]。此外，上述菌种产生色素的差异也有助于鉴定，上野卟啉单胞菌产生色素最多，而牙髓卟啉单胞菌产生色素最少[14]。胰蛋白酶阳性是牙龈卟啉单胞菌[84]和波戈纳卟啉单胞菌(*P. pogonae*)的典型生化模式。本诺卟啉单胞菌、巴斯德卟啉单胞菌、索氏卟啉单胞菌、卡托卟啉单胞菌和"支气管卟啉单胞菌"均为吲哚阴性，且除了本诺卟啉单胞菌外都可以弱水解糖[15-17,20]，这些特性与大多数卟啉单胞菌属菌种不同，可能导致临床实验室将上述菌种误鉴定为普雷沃菌属菌种[15-16]。本诺卟啉单胞菌生长缓慢，至少经过 10 天生长才能产生微弱色素，对万古霉素敏感性可变[17]。与其他卟啉单胞菌属菌种不同，在 GLC 中产生大量乙酸和琥珀酸，有些菌株触酶阳性。大多数动物来源的卟啉单胞菌属菌种可通过触酶阳性与人源的菌株区分[84]。对于波戈纳卟啉单胞菌，动物和人源分离株触酶均阳性[21]。表 56-6 为区分卟啉单胞菌属菌种的关键生化反应。

表 56-6　人源性卟啉单胞菌属菌种分离株的表型特征[a]

菌种	产生下列产物							糖发酵[b]
	Pigm	Ind	Cat	α-Fuc	β-NAG	胰蛋白酶	糜蛋白酶	
不解糖卟啉单胞菌	+	+	−	+	−	−	−	−
本诺卟啉单胞菌	W	−	V	−	+	−	+	−
"支气管卟啉单胞菌"[c]	−	−	−	+	+	−	W	Ma_v,R
卡托卟啉单胞菌	−	−	−	+	+	V	+	G,L,Ml,Ma,R
牙髓卟啉单胞菌	+	+	−	−	−	−	−	−
牙龈卟啉单胞菌	+	+	−	−	+	+	+	−
巴斯德卟啉单胞菌	−	−	−	+	+	−	−	G,L,Ml,Ma,R
波戈纳卟啉单胞菌[d]	−	+	+	−	+	+	+	G,L,Ml,Ma_v,R_v
索氏卟啉单胞菌	+	−	−	−	+	−	+	G,L,Ma
上野卟啉单胞菌	+	+	−	−	−	−	−	−

注：[a]+. 阳性；−. 阴性；V. 可变；W. 弱阳性；Pigm. 色素；Ind. 吲哚；Cat. 触酶；α-Fuc. α-岩藻糖苷酶；β-NAG. *N*-乙酰-β-氨基葡糖苷酶；G. 葡萄糖；L. 乳糖；Ma. 甘露糖；Ml. 麦芽糖；R. 棉子糖。[b] 弱反应和测试系统相关。[c] 支气管卟啉单胞菌是一个候选种，有 4 个分离株。[d] 波戈纳卟啉单胞菌型菌株和大多数分离株是从蜥蜴中分离出来的，但最近从人急性鼻窦炎和软组织感染中分离到 2 株

少数副普雷沃菌属菌种能产生吲哚，见表 56-7[41,43,84]。除了解肝素普雷沃菌和“马赛普雷沃菌”（未经批准，不在表 56-7 中），这些菌种和其他一些菌种皆产生色素[39-40,48,84]。有色普雷沃菌（*P. colorans*）培养 5 天后产生微量色素，但进一步孵育时色素加强。褐色普雷沃菌、斯科普斯普雷沃菌（*P. scopos*）和栖组织普雷沃菌的一些菌株因菌落中心能产生色素而呈牛眼样外观[39-40]。值得注意的是，不同的菌种产生色素的量和时间差异较大，在血平板上，色素产生的时间可以长至 14 天，程度可以从米色、棕色到黑色。从小肠穿刺标本新发现的菌种空肠普雷沃菌可以产生不同程度的溶血[48]。在卵黄琼脂平板上进行的脂酶试验也有助于鉴定：中间普雷沃菌和变黑普雷沃菌及许多洛氏普雷沃菌菌株呈阳性[251]。值得注意的是，仅凭表型方法不能将中间普雷沃菌与变黑普雷沃菌区分。除能产生色素和吲哚，普雷沃菌属菌种还能发酵各种糖。GLC 显示普雷沃菌属菌种糖代谢的主要终产物为乙酸和琥珀酸[252]。由于大量普雷沃菌属菌种是基于 16S rRNA 基因序列描述的，因此，仅凭生化试验难以进行准确鉴定。表 56-7 列举了鉴定普雷沃菌属菌种及相关菌属菌种有价值的生化反应。

表 56-7 拟普雷沃菌属和普雷沃菌属菌种的表型特征[a]

菌种	产物[b]					水解反应[c]		糖发酵反应[d]			
	Pigm	Ind	Lip	α-Fuc	β-NAG	Gel	Esc	Arab	Cellob	Lact	Salic
灰色拟普雷沃菌	−	−	ND	+	+	+	−	−	ND	+	−
坦纳拟普雷沃菌[e]	V	−	−	+	+	+	−	−	−	V	−
羊水普雷沃菌	−	−	−	−	+	−	+	ND	−	+	−
橘红色普雷沃菌	+	+	−[f]	+	−	+	−	−	−	−	−
巴隆普雷沃菌	−	−	−	+	+	W	+	−	+	+	+
卑尔根普雷沃菌	−	−	−	−	V	−	+	+	+	+	+
二路普雷沃菌	−	−	−	+	+	+	−	−	−	+	−
颊普雷沃菌	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+
口腔普雷沃菌	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+
有色普雷沃菌[e]	+	−	−[g]	−[g]	+[g]	+[g]	W[g]	−	+	+	−
粪便普雷沃菌	−	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+
人体普雷沃菌	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
牙普雷沃菌	−	−	−	−	+	−	+	+	+	+	−
栖牙普雷沃菌	V	−	−	+	+	+	+	−	−	+	−
双向普雷沃菌	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
栖居普雷沃菌	−	−	−	+	+	+	V	−	−	+	−
褐色普雷沃菌[e]	+	−	ND	+	+	−	−	−	+	+	W
解肝素普雷沃菌	−	+	−	+	+	−	+	+	+	+	+
栖组织普雷沃菌	V	−	−	+	+	+	−	−	−	+	−
中间普雷沃菌	+	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−
空肠普雷沃菌	+	−	ND	+	+	+	−	−	−	+	−
洛氏普雷沃菌	+	−	V	+	+	+	+	−	+	+	−
小斑点普雷沃菌	−	−	−	−	+	−	+	+	+	+	+
马氏普雷沃菌	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
产黑色普雷沃菌	+	−	−	+	+	+	V	−	−	+	−
闪亮普雷沃菌	+	+	−	+	+	+	−	−	+	+	+
多形普雷沃菌	−	−	−	V	+	+	−	−	+	+	−
食多糖普雷沃菌	−	−	−	−	+	+	+	V	+	+	V
南锡普雷沃菌	−	−	−	+	+	−	+	−	V	+	−
变黑普雷沃菌	+	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−

（续　表）

菌种	产物[b]					水解反应[c]		糖发酵反应[d]			
	Pigm	Ind	Lip	α-Fuc	β-NAG	Gel	Esc	Arab	Cellob	Lact	Salic
口普雷沃菌	−	−	−	+	+	V	+	−	+	+	+
口腔普雷沃菌	−	−	−	+	+	V	+	+	+	+	+
龈炎普雷沃菌(*P. oulorum*)	−	−	−	+	+	−	−	−	−	+	−
苍白普雷沃菌	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−
胸膜炎普雷沃菌(*P. pleuritidis*[e])	−	−	−	+	+	+	−	−	−	+	−
解糖普雷沃菌	−	−	ND	−	+	W	+	+	+	+	+
唾液普雷沃菌	−	−	−	W	+	−	+	+	+	+	+
斯科普斯普雷沃菌[e]	+	−	ND	+	+	+	−	−	−	+	−
夏氏普雷沃菌	+	−	−	W	+	+	−	−	−	+	−
粪普雷沃菌	−	−	−	+	+	−	−	−	−	+	−
蒂莫内普雷沃菌[e]	−	−	−	+	+	+	−	−	−	+	−
真口腔普雷沃菌	−	−	−	+	+	V	+	−	+	+	−
动胶普雷沃菌	−	V	−	+	+	V	+	V	+	+	V

注：[a] +. 阳性；−. 阴性；V. 可变；W. 弱阳性；ND. 无数据。[b] Pigm. 色素；Ind. 吲哚；Lip. 脂肪酶；α-Fuc. α-岩藻糖苷酶；β-NAG. *N*-乙酰-β-氨基葡糖苷酶。[c] Gel. 明胶；Esc. 七叶苷。[d] Arab. 阿拉伯糖；Cellob. 纤维二糖酶；Lact. 乳糖；Salic. 水杨苷。[e] 反应数据根据单个菌株的试验获取。[f] 由 Gürsoy 等补充试验[251]。[g] 由德国 Tübingen，M. Buhl 实验室测试，但尚未发表

梭杆菌门细菌可以通过有限数种简单的试验进行推测性鉴定，包括革兰染色细胞形态、在 20% 胆汁中的生长能力、产生吲哚等，但种水平的确定性诊断还需要增加生化试验（表 56-8）。采用 GLC 测定挥发性脂肪酸，检测从乳酸和（或）苏氨酸产生丙酸可用于区分不同的梭杆菌属菌种[84]。具核梭杆菌菌落呈白色、淡黄色（紫外光下呈黄绿色）、斑点状或面包屑样菌落，菌落异质性很大。该菌有 5 个亚种：具核梭杆菌动物亚种、具核梭杆菌梭形亚种、具核梭杆菌具核亚种、具核梭杆菌多形亚种和具核梭杆菌文森特亚种，但表型试验不能将该菌鉴定到亚种水平。此外，表型试验也不能将牙周梭杆菌与具核梭杆菌区分。坏死梭杆菌的临床重要性日益增加，该菌有两个亚种，坏死梭杆菌香肠形亚种主要分离于人类感染标本，而坏死梭杆菌坏死亚种则常分离于动物感染标本[163,165,239]。这两个亚种都是吲哚和脂酶阳性，但可以通过菌落形态和表型试验，如红细胞凝集试验将它们区分[239]。含萘啶酸、万古霉素及不加热处理的脱纤维马血的选择性平板，可以直接检查坏死梭杆菌的 β 溶血，高浓度菌量的咽拭子孵育 2 天后检测坏死梭杆菌的可靠性几乎与实时定量 PCR 相同[253]。一种有趣的可能性，由于经济上的原因，直接用青少年咽拭子进行培养鉴定坏死梭杆菌，随后进行抗菌治疗，可以减少并预防侵入性感染并发症[186]。BBE 平板上，吲哚阴性、多形性的厌氧菌可以推测性鉴定为死亡梭杆菌[84]。溃疡梭杆菌与吲哚阴性的可变梭杆菌高度相似，但能够还原硝酸盐。所有梭杆菌门细菌都能产生大量丁酸作为其代谢终产物（表 56-2）。此外，GLC 显示舟形梭杆菌、鲁斯梭杆菌和可变梭杆菌能产生乳酸[84]。

纤毛菌属和较严格厌氧的斯尼思菌属初次培养时为厌氧菌，但次代培养时，某些菌株可以在含 CO_2 的需氧环境中生长[59]。这些细菌为大纺锤形，但菌种间细胞的形态变化很大：口腔纤毛菌、霍夫斯德纤毛菌、沙阿纤毛菌和特雷维桑纤毛菌为长杆菌，古德费诺纤毛菌和韦德纤毛菌的菌体相对较短，羊水斯尼思菌（以前是“羊水纤毛菌”）为多形性球杆菌和纺锤形，需血斯尼思菌为带细丝的多形性杆菌[58,61,202,240]。有趣的是，羊水斯尼思菌被描述为超过 10 μm 的可变大小的杆菌，但电子扫描显微镜揭示该菌形成的长杆菌实际上是由带圆末端的杆菌呈链状排列而成[62]。其新鲜细胞可能为革兰染色阳性[59]。纤毛菌属和斯尼思菌属糖代谢的主要终产物为乳酸（见表 56-2）。斯尼思菌属菌种极度苛养，因此，对它们的生化特征所知甚少[61-62,198,202]。羊水斯尼思菌的基因组序列

分析显示其基因组较小，这可能是导致其苛养和万古霉素敏感的原因[62]。有报道该菌在Rapid ID 32A(bioMérieux)中呈β-葡糖醛酸糖苷酶、碱性磷酸酶、精氨酸芳基酰胺酶及棉籽糖阳性[198,202]。表56-9为鉴定纤毛菌属和斯尼思菌属菌种的生化特征。

表 56-8 梭杆菌属细菌的表型特征[a]

菌种	细胞形态	20%胆汁生长	产物		丙酸转化	
			吲哚	脂肪酶	乳酸	苏氨酸
微生子梭杆菌	分生体	−	+	−	−	+
"哈娃苏科梭杆菌(*F. hwasookii*)"[b]	大小可变的梭形	−[c]	+	−	n. t.	n. t.
死亡梭杆菌	形态多样，菌体大，较圆	+	−	−	−	+
舟形梭杆菌	船形	−	+	−	−	−
坏死梭杆菌		V	+	+	+	+
坏死梭杆菌香肠形亚种	球菌/形态多样，弯曲、缠结					
坏死梭杆菌坏死亚种	形态多样，完整					
具核梭杆菌	菌体细长，末端点状	−	+	−	−	+
牙周梭杆菌	菌体细长	−	+	−	−	+
鲁斯梭杆菌	菌体大，末端圆形	−	−	−	−	−
可变梭杆菌	菌体大，末端圆形	+	V	V	−	+
溃疡梭杆菌	菌体大，末端圆形	+	−	−	−	+

注：[a]+. 阳性；−. 阴性；V. 可变。[b]基于5个分离株的候选菌种。[c]由韩国Gwangju的J.-K. Kook实验室进行测试，但尚未发表

表 56-9 纤毛菌属和斯尼思菌属菌种的一些特性[a]

菌种	β-溶血	产物						
		Cat	α-Gal	β-Gal	α-Glu	β-Glu	β-NAG	PAL
口腔纤毛菌	−	−	+	−	+	+	−	+
古德费诺纤毛菌	+	+	−	+	−	+	+	+
霍夫斯德纤毛菌	+	+	−	−	+	+	−	+
香港纤毛菌[b]	−	−	−	−	+	+	−	+
沙阿纤毛菌	−	+	−	−	+	−	−	−
特雷维桑纤毛菌	ND	+	−	−	+	+	+	+
韦德纤毛菌	+	+	−	−	+	+	−	−
羊水斯尼思菌[c]	ND	−	−	−	−	−	−	+
需血斯尼思菌	ND	−	−	−	−	−	−	+

注：[a]+. 阳性；−. 阴性；ND. 无数据；α/β-Gal. α/β-半乳糖苷酶；α/β-Glu. α/β-葡糖苷酶；β-NAG. *N*-乙酰-β-氨基葡糖苷酶；PAL. 碱性磷酸酶。[b]反应数据根据单个菌株的试验获取。[c]万古霉素敏感

互养菌门中，苛求依赖杆菌[63]、人荣凯菌[64]以及鱼腥味锥形杆菌[65]和新描述的人锥形杆菌(*R. hominis*)[66-67]是迄今能够从人源性标本培养到的仅有的几个菌种。它们极为苛养，需要孵育7～21天，因此描述它们的特征极为困难。这些互养菌门细菌为不水解糖的杆菌，其糖代谢的主要终产物为乙酸(人锥形杆菌产乙酸和丙酸)。苛求依赖杆菌在血平板上形成非常小、高度凸起的菌落，但菌落形态可变[63]。当该菌与坏死梭杆菌具核亚种共同培养时才能获得最佳生长。苛求依赖杆菌有动力，与人荣凯菌和鱼腥味锥形杆菌不同，人荣凯菌对胆汁敏感，在血琼脂上形成针尖样菌落，而鱼腥味锥形杆菌的菌落则相对较大，呈凸起金字塔状，有特殊的鱼腥味[64-65]。人锥形杆菌

(*R. hominis*)呈不规则的杆状，即使长时间孵育后仍呈点状菌落，鱼腥味也很典型[66]。所有菌种对大多数生化试验均不敏感。在 Rapid ID 32A system (bioMérieux)中，苛求依赖杆菌和人栄凯菌均为甘氨酸芳基酰胺酶和亮氨酰甘氨芳基酰胺酸酶阳性，而鱼腥味锥形杆菌的甘氨酸芳基酰胺酶则为强阳性[63-65]。尽管最近从人菌血症病例中分离出杆菌属细胞(*Cloacibacillus*)，如埃文斯木质素杆菌(*C. evryensis*)和豪猪木质素菌(*C. porcorum*)[67]，但其基本特征还未被完全定义，临床微生物实验室常规方法无法鉴定出这些严格厌氧的革兰阴性杆菌。这三株人源菌株对万古霉素和黏菌素耐药，对卡那霉素敏感[66-67]。

戴阿李斯特菌属菌种为球杆菌，在血平板上形成细小菌落。在液体培养基中生长不良，不水解糖；由于缺乏传统生化反应，因此鉴定困难。由于它们菌落细小，所以常与韦荣球菌混淆。Rapid ID 32A 系统(bioMérieux)中有几个酶反应在区分戴阿李斯特菌属的 3 个菌种中非常有用：侵肺戴阿李斯特菌(*D. pneumosintes*)甘氨酸芳基酰胺酶阳性，微嗜氧戴阿李斯特菌丙氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、酪氨酸芳基酰胺酶、精氨酸双水解酶阳性，喜琥珀酸戴阿李斯特菌碱性磷酸酶阳性[30,72]。但在该试剂盒中，浑浊戴阿李斯特菌和产丙酸戴阿李斯特菌(*D. propionicifaciens*)上述所有反应均阴性。后一种细菌能产生丙酸，该产物可用 GLC 检测[72]。临床标本中戴阿李斯特菌常需要用分子方法，如 16S rRNA 测序来鉴定到种[72,207]。

沃兹沃思嗜胆菌分离株不水解糖，耐胆汁，触酶强阳性，大多数菌株脲酶阳性[78]。该菌还可产生硫化氢，胆汁(牛胆汁)和丙酮酸盐可刺激其生长。该表型模式加上 BBE 平板上的菌落特征可获得可靠的鉴定。

两个人源性萨特菌属菌种沃兹沃思萨特菌和小红萨特菌，以及两个人源性副萨特菌属菌种人粪副萨特菌和第二副萨特菌为不水解糖、生化反应不活泼的细菌。迄今，仅沃兹沃思萨特菌可从感染标本中分离。人粪副萨特菌、第二副萨特菌和小红萨特菌为严格的厌氧菌，菌细胞呈球形，硝酸盐还原反应阴性[73,77,254]，而沃兹沃思萨特菌为直杆菌，可在微需氧条件下生长，能还原硝酸盐。

分离自人类标本的有动力革兰阴性厌氧菌中，月形单胞菌和厌氧螺菌属可水解糖，而居福西亚菌属(*Phocaeicola*)和脱硫弧菌属不水解糖。与其他菌种不同，脱硫弧菌属菌种脱硫绿胺霉素试验阳性，该特性可通过滴加 2 mol/L NaOH 于挑取菌膜拭子上，在紫外光下观察红色荧光[72,222]。口腔脱硫微菌为直杆菌，脱硫绿胺霉素试验阴性。口腔脱硫微菌和脱硫弧菌属菌种能通过消耗氢来还原硫酸盐产生 H_2S，发酵的最终产物[80]。脓肿居福西亚菌(*P. abscessus*)为慢生长球杆菌，丛鞭毛[255]。月形单胞菌属菌种的鞭毛排列在菌细胞的凹端，而百足菌属的鞭毛则环绕菌细胞排列[74]。厌氧螺菌属菌种外形呈螺旋形，有跳跃式动力。产琥珀酸厌氧螺菌(*A. succiniciproducens*)对黏菌素敏感，发酵葡萄糖、甘露糖、乳糖和蔗糖。托马斯厌氧螺菌(*A. thomasii*)可通过糖发酵试验及α-葡糖苷酶和β-半乳糖苷酶的活性与产琥珀酸厌氧螺菌区分，前者两个酶阴性，后者两个酶阳性[81]。脱硫弧菌属菌种为弯曲杆菌，有快速、进行性动力(除无动力的懒惰脱硫弧菌外)，对黏菌素和 20%胆汁耐药(除对胆汁敏感的脱硫脱硫弧菌外)[222]。一套简单的试验，包括触酶、吲哚、硝酸盐和脲酶试验，能够将 4 种可从人临床标本分离的脱硫弧菌属菌种区分[222]。表 56-10 为有动力革兰阴性厌氧菌属的鉴定方案。

表 56-10　有动力革兰阴性杆菌的表型特征[a]

菌属	硝酸盐还原	七叶苷水解	产物								糖发酵	
			Cat	Ind	Urea	α-Glu	α-Gal	β-Gal	α-Fuc	β-NAG	Man	Raf
厌氧螺菌属												
产琥珀酸厌氧螺菌	−	−	−	−	−	+	−	+	−	+	ND	+
托马斯厌氧螺菌	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	ND	−
月形单胞菌	V					V						
蛛形月形单胞菌		−	−	−	−		−	−	−	−	+	−
黛安娜月形单胞菌	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	V

（续 表）

菌属	硝酸盐还原	七叶苷水解	产物								糖发酵	
			Cat	Ind	Urea	α-Glu	α-Gal	β-Gal	α-Fuc	β-NAG	Man	Raf
福氏月形单胞菌	+	−	−	−	−	+	V	−	−	−	+	V
不幸月形单胞菌	+	+	−	−	−	V	V	−	−	−	+	+
有害月形单胞菌	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
生痰月形单胞菌	V	−	−	−	−	W	+	V	−	−	−	+
脱硫弧菌属												
脱硫脱硫弧菌	+	ND	−	−	+	ND	ND	ND	ND	ND	"−"	"−"
费非脱硫弧菌	+	ND	+	−	−	ND	ND	ND	ND	ND	"−"	"−"
懒惰脱硫弧菌[b]	−	ND	−	−	−	ND	ND	ND	ND	ND	"−"	"−"
普通脱硫弧菌	−	ND	−	+	−	ND	ND	ND	ND	ND	"−"	"−"
居福西亚菌属												
脓肿居福西亚菌	−	−	−	−	ND	W	+	+	+	+	"−"	"−"

注：[a]+. 阳性；−. 阴性；"−"，脱硫弧菌属和居福西亚菌属为不水解糖；V. 可变；W. 弱阳性；ND. 无数据；Cat. 触酶；Ind. 吲哚；α-Glu. α-葡糖苷酶；α-Gal. α-半乳糖苷酶；β-Gal. β-半乳糖苷酶；α-Fuc. α-岩藻糖苷酶；β-NAG. *N*-乙酰-β-氨基葡糖苷酶；Man. 甘露糖；Raf. 棉子糖。[b]无动力

(三)基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)进行全细胞细菌鉴定是非常有前途的厌氧菌鉴定方法，包括革兰阴性菌[251,256-260]。可以使用分类水平上保守的蛋白质作为鉴定靶标，如核糖体蛋白。这些特征性的多肽和小分子蛋白质(m/z，范围为 3～15 kDa)可以先将全细胞、细胞溶解物或细菌粗提物离子化，再用激光脱靶后进行测量。该方法的准确鉴定依赖于数据库中未知微生物的量。目前，有两套系统可用于常规鉴定需氧菌和厌氧菌：①MALDI Biotyper system (Bruker Daltonik GmbH，Bremen，Germany)，该系统使用 microflex 或 autoflex MS 及 MALDI Biotyper 数据库[版本：仅用于研究和体外诊断(IVD)]；②Vitek MS(bioMérieux)，使用 Shimadzu Axima MS 系统 IVD 数据库(V3.0，2016)和 SARAMIS(授权版本 V4.14.0，2016-06)数据库仅用于研究。目前，Biotyper(BrukerDaltonik)系统包含的厌氧菌菌种更多。与表型鉴定方法或 16S rRNA 基因测序相比，MALDI-TOF MS 对革兰阴性厌氧菌在种或属水平鉴定正确的百分率依赖于厌氧菌领域不同系统数据库的积极开发[257-260]。不同的标本准备方法可能影响鉴定正确率；但是，无论是直接涂片还是完全化学抽提法，目前在拟杆菌属和梭杆菌属菌种试验菌株的鉴定中尚未观察到显著性差异[261]。一项研究表明，123 株临床分离的普雷沃菌属的细菌，有 60% 是通过直接涂点法鉴定的，14% 是反复操作鉴定的，而 26% 需要乙醇-甲酸抽提法鉴定[251]。拟杆菌属菌株可以获得种水平的鉴定结果，而梭杆菌属菌株常只鉴定到属水平，在属的鉴定中遇到的困难可以通过向数据库增加已知菌株的方法解决。拟杆菌属和普雷沃菌属内甚至进化关系上密切相关的菌种也可通过 MALDI-TOF MS 获得正确的鉴定结果，如萨耶斯拟杆菌和诺德拟杆菌[257]，或中间普雷沃菌和变黑普雷沃菌[258-259]。然而，新的菌种可能被错误地鉴定为其亲缘相近的菌种，如橘红色普雷沃菌被鉴定为中间普雷沃菌，空肠普雷沃菌被鉴定为产黑色普雷沃菌[251]。如某些其他需氧菌和厌氧菌菌种中所见，峰漂移现象可用于脆弱拟杆菌Ⅰ型和Ⅱ型的分型[262-263]。由于只有Ⅱ型菌株才含有 *cfiA* 基因(该基因产生碳青霉烯酶)，通过 MALDI-TOF MS 对脆弱拟杆菌进行分型可以直接影响抗菌治疗方案[264]。

(四)基因鉴定方法

另一个能对未命名及已知菌种进行可靠鉴定的方法是 16S rRNA 基因序列分析[265]。从临床的角度看，该基因 5′末端 500 bp 的序列就能够将该群内大多数(不是全部)细菌鉴定到种的水平。采用 V6 特异性引物甚至能从单位长度的扩增产物得到更多的信息[233]。这些方法在鉴定厌氧菌中的应用日益增多，因为测定该基因部分序列要

比生化反应更快、更准确，还不依赖其生长特征[155,266]。最近研究表明，测定 *rpoB* 基因序列也是很有潜力的细菌鉴定方法[267]。例如，*rpoB* 基因分析能够成功地区分两个密切相关的梭杆菌属菌种：具核梭杆菌和牙周梭杆菌，以及用于口腔分离株和肠道活检分离株的比较[268]。

许多临床实验室还不能将测序作为常规方法应用。已经有学者提出开发一套规则筛选那些能用传统方法充分鉴定的菌株并用 16S rRNA 基因测序对那些难以鉴定的菌株进行鉴定[115,265]。同时，现在已有商品化的以 16S rRNA 基因测序为基础的含有 DNA 抽提试剂和扩增试剂的鉴定试剂盒。但是，该法需要仪器，包括 DNA 扩增仪、自动基因测序仪及结果解释软件，目前尚无可用的评估革兰阴性厌氧菌鉴定价值所必需的数据。相比传统方法，16S rRNA 基因测序法快速，TA 时间短，是非常有用的鉴定苛养厌氧菌的方法。但是，分子分析法只能作为传统方法的补充，不能替代传统方法。当参考数据库序列资料不完整、测序数据很难解释时，培养和生化试验获得的表型特征有助于测序数据分析。更重要的是，培养是临床标本分离菌株抗菌药物敏感试验必要的基础。

(五)未能培养的厌氧革兰阴性杆菌

许多慢性感染中，可以检测到数种未能培养的代表革兰阴性厌氧菌门微生物。人类口腔中，普雷沃菌属、梭杆菌属、戴阿李斯特菌属和月形单胞菌属，以及互养菌门中未能培养的细菌与各种口腔及非口腔感染相关[100]。扁桃体隐窝微生物群含有未能培养的微生物，例如卟啉单胞菌属基因型（与卡托卟啉单胞菌最相关）与儿童非炎症型扁桃体显著相关，而 2 个梭杆菌属的菌种则与成人复发性扁桃体炎相关[99]。对脑脓肿的宏基因组测序分析结果显示，在鼻窦炎或牙科治疗史患者的脓液标本中，发现了数种拟杆菌门和硬壁菌门中未能培养的菌种[176]。在女性生殖道中，数种普雷沃菌样进化型与细菌性阴道病密切相关[97]。目前认为，慢性静脉性下肢溃疡存在多种微生物混合感染，其中未知的拟杆菌是最常见的细菌[269]。

八、抗菌药物敏感试验

革兰阴性厌氧菌对抗厌氧菌药物的耐药性日益增加[110,112,116,270-276]。尽管同一菌属内不同菌种对抗菌药物的敏感性差异很大，但大多数临床实验室既不对分离的厌氧菌菌株进行准确的种水平鉴定，也不进行药敏试验[243]。不知道当地厌氧菌的药敏模式，严重妨碍了抗感染治疗方案的选择，使抗厌氧菌治疗效果变得不可预测。表 56-11 总结了目前临床上常见的革兰阴性厌氧菌的耐药率。

表 56-11 抗常见革兰阴性厌氧菌药物的抗菌活性[a]

抗菌药物	试验菌株的耐药率(%)				
	脆弱拟杆菌	非脆弱拟杆菌	副拟杆菌属	普雷沃菌属	梭杆菌属
阿莫西林/克拉维酸	0～23	4～33	0～21	6	2～7
氨苄西林/舒巴坦[b]	2～17	0～50	21～22	0	0
哌拉西林/他唑巴坦[b]	1～11	0～15	0～14	0	0
头孢西丁[b]	4～14	6～67	11～39	0	0
多立培南	1～7	0～4	0	0	0
厄他培南	1～5	0～4	0	0	0
亚胺培南	<1～3	0～2	4	6	4
美洛培南[b]	1～6	0～5	0～25	0	0-8
替加环素[b]	0～8	0～42	0～9	0	0
利奈唑胺	6	0～11	11	ND	ND
莫西沙星	7～36	0～56	0～27	19～24	0
克林霉素[b]	17～37	21～72	14～55	20～70	5～30
甲硝唑[b]	0～<1	0～2	0	0	0
氯霉素	3	0～4	ND	0	4

注：[a] 数据摘自参考文献[110][112][116][270][273-275][277]和[290]；ND. 无数据。[b]参考文献[290]提供的是中介/耐药量和耐药率

最近在美国、加拿大、阿根廷、科威特、中国台湾地区及数个欧洲国家进行的厌氧菌耐药监测的结果显示:上述所有国家或地区,脆弱拟杆菌群细菌都是对各种抗菌药物最为耐药的厌氧菌,这种耐药与地理环境无关[110,112,116,270,272-274,277-281]。但是,不同国家和地区间不同菌种的耐药率也有差异。美国开展了一个大型系列研究,追踪了1997—2007年脆弱拟杆菌群细菌对下列药物敏感性模式:厄他培南、亚胺培南、美罗培南、氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢西丁、克林霉素、莫西沙星、替加环素、氯霉素和甲硝唑等[110]。首株甲硝唑耐药菌株是2002年在美国检出,但目前对甲硝唑的敏感性仍能维持稳定。一项为期3年的研究显示,>1300株厌氧菌菌株中,脆弱拟杆菌仍然是最敏感的菌种。检测的菌株中,不同的菌种显示对数种抗菌药物高度耐药,尤其是对克林霉素和莫西沙星。此外,在脆弱拟杆菌、卵形拟杆菌、多形拟杆菌和单形拟杆菌(*B. uniformis*)中还检出了一些对碳青霉烯耐药的菌株[110]。欧洲开展的一项耐药监测研究检测了2008年1月至2009年3月从13个国家收集的824株脆弱拟杆菌群分离株,结果显示试验菌株对下列药物的耐药性日益增加:阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦、头孢西丁、克林霉素和莫西沙星;而对亚胺培南、甲硝唑和替加环素的耐药率仍然较低[116]。在随后的研究中,对这些菌株的一部分进行了16个耐药基因的检测,以确定每个基因相对应的耐药表型[282]。加拿大的研究中,检测了2010年1月至2011年8月从9家医院的实验室收集的387株脆弱拟杆菌菌群的分离株对10种抗菌药物的敏感性[270];其中有超过1/2的菌株为脆弱拟杆菌,卵形拟杆菌和多形拟杆菌也很常见(>10%)。耐药率最低的药物是甲硝唑、哌拉西林/他唑巴坦、亚胺培南和厄他培南,卵形拟杆菌和多形拟杆菌常对数种抗菌药物耐药[270]。上述结果支持对严重感染患者分离株需要将厌氧菌鉴定到种水平及对单个分离株进行药敏试验。中国台湾的医院开展的厌氧菌耐药性监测发现,2000—2007年,拟杆菌属、普雷沃菌属和(或)梭杆菌属菌种对许多药物的敏感性在下降,尤其是头孢美唑、克林霉素和氨苄西林/舒巴坦[112]。值得注意的是,从血液中分离的脆弱拟杆菌、梭杆菌属和普雷沃菌属分离株存在对碳青霉烯类抗菌药物中介或耐药的菌株;其中一株脆弱拟杆菌甚至对所有四种碳青霉烯类抗菌药物都耐药[112]。事实上,血液分离菌株的敏感性似乎比来自腹腔、产科或其他感染的分离株的敏感性更低[283]。

现在已经分离到多重耐药脆弱拟杆菌及一些多重耐药多形拟杆菌、普通拟杆菌和狄氏副拟杆菌菌株,标本主要来源于手术后血液和脓液,但也有来源于高水平抗菌药物使用科室的那些接受治疗的癌症患者的粪便标本,这些菌株对抗厌氧菌药物耐药,如碳青霉烯、β-内酰胺/β-内酰胺酶抑制剂、克林霉素和(或)甲硝唑[270,284-285]。有趣的是,其中1例使用利奈唑胺成功治疗[286]。*cfiA* 基因调节介导碳青霉烯耐药的金属β-内酰胺酶的表达,*cfiA* 阳性的脆弱拟杆菌对亚胺培南和美罗培南的MIC增加,而 *cfiA* 阴性菌株则敏感[263]。此外,*cfiA* 可与 *nim* 关联出现,*nim* 基因介导对硝基咪唑类药物耐药[287]。插入元件在 *cfiA* 的表达中起重要作用,并可能影响临床治疗结果[288]。

尽管甲硝唑在抗厌氧菌感染中应用广泛,但该药的获得性耐药仍很少见[289]。美国、中国台湾和中国香港开展的一项耐药性监测显示,甲硝唑耐药的拟杆菌属菌株非常少见[110,112,274,290],但在欧洲却很常见[116,280-281,291]。携带 *nim* 基因的拟杆菌属和普雷沃菌属菌株长期接触甲硝唑可选择出耐药菌[292-293]。从法国两家大学医疗中心的各种感染患者分离到的188株普雷沃菌属菌株中,所有30株 *nim* 基因阳性的普雷沃菌属菌株(大部分菌株延长了培养时间)都表现出对甲硝唑敏感性降低,其MIC为8~32 μg/ml[292]。有趣的是,上述菌株没有一株携带已知的 *nim* 基因,在7株对甲硝唑敏感的巴隆普雷沃菌(*P. baroniae*)菌株中发现了一个新的 *nim* 基因。少见的普雷沃菌属菌种可呈甲硝唑或者克林霉素高度耐药,治疗效果差[294-296]。相当数量的从各种临床标本分离的戴阿李斯特菌属菌株对甲硝唑敏感性降低,却不含 *nim* 基因[206]。

以前认为较新的氟喹诺酮类药物有良好的抗厌氧菌效果,包括杀菌活性[297],但是对莫西沙星的耐药性在快速增加[116,271]。情况还在恶化,尤其是非脆弱拟杆菌菌种。例如,在阿根廷,屎拟杆菌、粪便拟杆菌(*B. stercoris*)、单形拟杆菌、普通拟杆菌和狄氏副拟杆菌(以前为拟杆菌属细菌)被列为莫西沙星耐药率最高的厌氧菌[277]。监测数据显示,希腊有多毛假解黄酮菌(*Pseudoflavonifractor capillosus*)(以前为拟杆菌属细菌)流行,对莫西沙星的耐药率高,该研究中菌株的鉴定未采用

基因序列测定方法[298]。相对较新的抗菌药物替加环素和利奈唑胺有良好的抗厌氧菌效果，但有报道称拟杆菌属和副拟杆菌属菌株对替加环素的耐药在增加[271,290]。在非脆弱拟杆菌属细菌中发现了相当数量的中介/耐药菌株，如粪拟杆菌（*B. caccae*）和多形拟杆菌[290]。值得注意的是，MIC 升高（>4 μg/ml）的拟杆菌属菌株可含有 *tetX* 和 *tetX1* 基因，提示该菌株具备发展为替加环素耐药并播散的能力[299]。此外，替加环素治疗效果和治疗安全性的问题也已引起人们的关注[300]。

尽管琼脂稀释法是推荐的厌氧菌药敏试验方法，但许多研究显示 Etest（bioMérieux）检测临床标本厌氧菌分离株的药敏结果可靠[292-293]。Etest 简单方便，是临床实验室有效的检测药物敏感性的方法。使用标准的 48 h 孵育时间可能会漏检某些慢生长的甲硝唑耐药菌株；因此推荐用 Etest 法进行药敏时，应孵育至 72 h，仔细检查甲硝唑抑菌圈内是否存在细小的菌落[292,294]。另一种检测临床分离株（包括厌氧菌）抗菌药物敏感性的梯度折点方法是 M. I. C evaluator device（Thermo Fisher Scientific，Basingstoke，United Kingdom）。该方法的效果与 Etest 法相似，但在检测脆弱拟杆菌群菌种对青霉素和甲硝唑的敏感性时，观察到一些与参考方法琼脂稀释法不一致的结果[301]。鉴于碳青霉烯类的 MIC 在增加，可用 MBL Etest 条（bioMérieux）检测菌株是否产生碳青霉烯酶。厌氧菌药物敏感性试验方法的详细描述见第 77 章。

一般说来，碳青霉烯类、某些 β-内酰胺/β-内酰胺酶抑制剂复合药、氯霉素和甲硝唑是最有效的抗厌氧菌药物，目前认为大多数头孢菌素、克林霉素和大多数喹诺酮对重症感染中的革兰阴性厌氧菌的抗菌活性较弱[2,110,112,116,270,277,279,283]。

九、结果的评价、解释和报告

熟悉各个身体部位定植的微生物群落及厌氧菌在疾病中的作用，可以更好地推测引起感染的可能菌种。考虑到目前大量的厌氧菌菌血症和脓毒症[106-107,111]、越来越多的患者感染梭杆菌，尤其是坏死梭杆菌相关的侵袭性疾病[163,175]，以及厌氧菌对各种抗菌药物的耐药率的报道日益增加[112,270-271]，临床微生物学实验室亟须引入先进的厌氧菌检测及精确的厌氧菌鉴定方法。当微生物鉴定不精确、抗菌药物选择不恰当时，病死率及治疗失败率将显著增加[302]。临床标本的采集应当避免黏膜定植菌的污染，使用合适的转运培养基并及时送检以保证厌氧菌的活性。恶臭、感染位置邻近黏膜表面、形成脓肿及组织坏死均提示标本中可能有厌氧菌。当患者病情严重、无治疗反应、需要延长治疗时，所有从正常无菌部位采集的标本分离到的厌氧菌均应进行明确的鉴定（至少鉴定到属），这些部位包括血、脑脊液、器官或体腔。参考实验室应定期提供当地临床重要的厌氧菌的药敏模式。不过，治疗厌氧菌感染不仅需要准确的抗感染治疗，还需要恰当的手术，如排脓及切除坏死组织。需注意的是，慢性感染损伤，特别是细菌包裹在生物被膜内，可导致抗菌药物扩散能力的降低和 MIC 升高。

培养出革兰阴性厌氧菌分离株时，结果解释中最重要、最困难的是确定该菌是感染病原菌还是污染菌。从正常无菌部位分离的所有分离株都应当视为有意义的病原菌。其次是这些细菌引起的感染常为混合感染，标本中可出现多种不同的菌种，常形成生物被膜。获取纯培养菌种进行药敏试验需时长，其耐药谱还可能相互冲突，导致抗菌治疗困难。幸运的是，这种感染通常对经验性治疗反应良好，部分清除感染部位混合菌则足以使机体的防御系统应对感染。

参考文献请扫二维码查阅

第7篇

弯曲和螺旋形革兰阴性杆菌

第57章 弯曲和螺旋形革兰阴性杆菌的鉴定流程

IRVING NACHAMKIN

（杜鸿 译；许建成 审校）

弧形和螺旋形细菌有共同的显微镜下形态，但代表着不同细菌病原体。这些微生物表现为弯曲、螺旋状或螺旋形的革兰阴性杆菌。特定检测这些微生物可能需要组合测试，包括显微镜检查、组织的病理染色、生化检查、抗原检查、血清学试验、细菌学培养和分子诊断。

该类细菌大多数分离自胃肠道相关感染的患者。空肠弯曲菌空肠亚种（*Campylobacter jejuni* subsp. *Jejuni*）是最常分离到的与腹泻相关的弯曲革兰阴性杆菌，但使用合适的培养条件，其他弯曲菌（*Campylobacter*）、螺杆菌属（*Helicobacter*）、弓形杆菌属（*Arcobacter*）和弧菌属（*Vibrio*）均可以从常规粪便培养中检测到（图 57-1）。同性恋螺杆菌（*Helicobacter cinaedi*）和芬内尔螺杆菌（*Helicobacter fennelliae*）是 2 个分离自排泄物标本最重要的螺杆菌（第 59 章）。幽门螺杆菌（*Helicobacter pylori*）是分离自胃组织的最常见革兰阴性弯曲杆菌，但其他的螺杆菌也有报道分

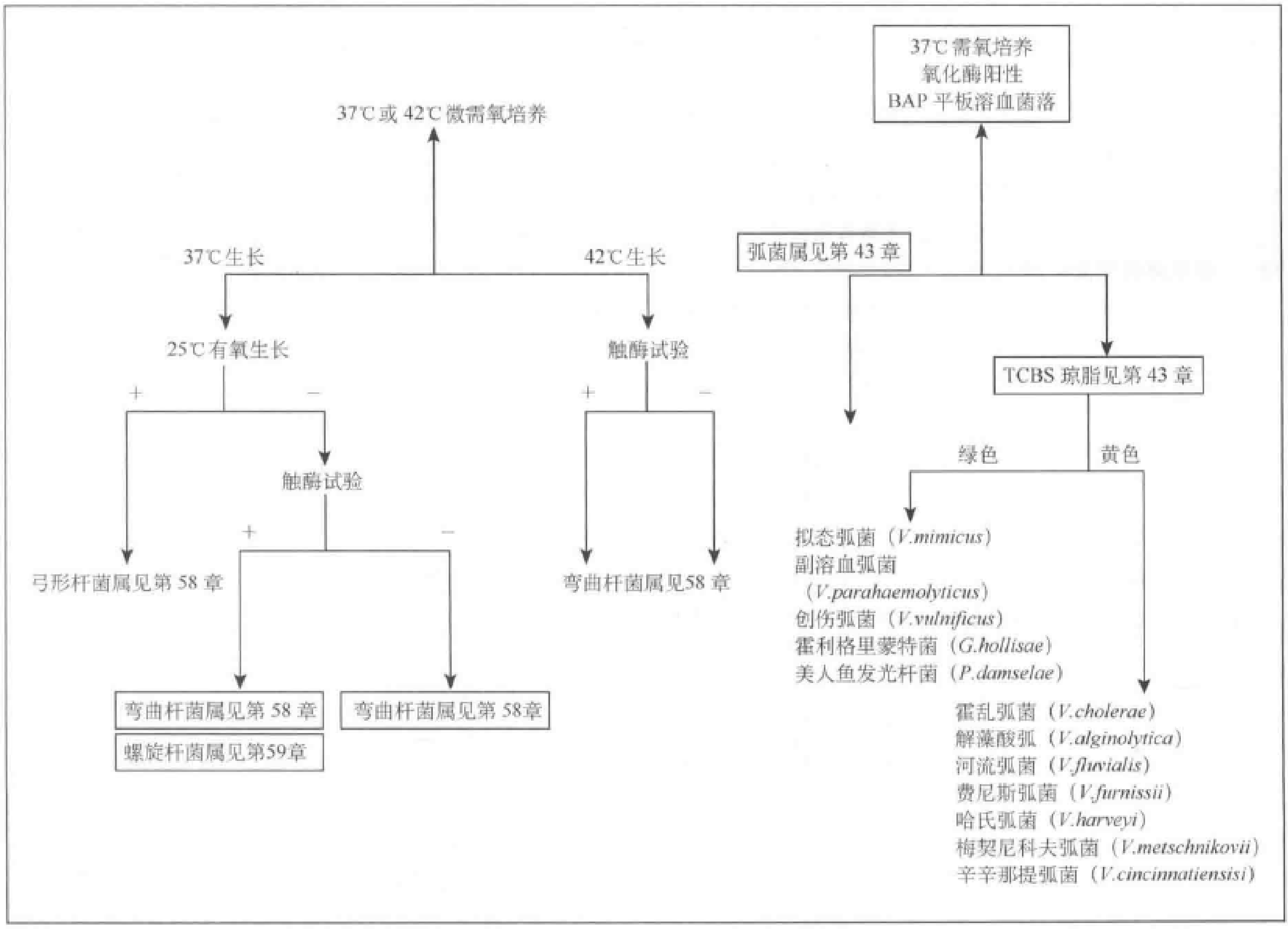


图 57-1 鉴定粪便样本的弯曲革兰阴性杆菌流程

注：BAP. 绵羊血琼脂平板；TCBS. 硫代硫酸盐-枸橼酸盐-胆盐-蔗糖

离自胃组织。值得关注的是，弯曲菌属和弧菌属更多的可以通过新型的核酸扩增试验（nucleic acid amplification testing，NAAT）从粪便样本中检测出，而不再需要通过培养的方法（第43章和第58章）。

其他较少分离到的弯曲的革兰阴性杆菌包括厌氧菌——脱硫弧菌属（*Desulfovibrio*）、沃兹沃思萨特菌（*Sutterella wadsworthensis*）、产琥珀酸沃林菌（*Wolinella succinogenes*）和产琥珀酸厌氧生活螺菌属（*Anaerobiospirillum succiniciproducens*），其可分离自血液、脓汁或其他临床标本（表57-1）。某些氧化酶阳性的非发酵菌，包括草螺菌属（*Herbaspirillum*）（第45章），也可具有弯曲的形态。

疏螺旋体属（*Borrelia*）（第61章）和钩端螺旋体属（*Leptospira*）（第60章）可引起系统性感染，但临床微生物实验室不常分离到，通常需专门的特殊培养基。这些细菌严格需氧，其最佳生长温度为28～30℃（钩端螺旋体属）和30～33℃（疏螺旋体属）。对梅毒螺旋体（*Treponema*）（第62章）的鉴定方法，包括临床表现和流行病史，以及显微镜检查、血清学试验和分子生物学检测等。

表57-1 可在临床标本中遇到的弯曲革兰阴性杆菌[a]

临床疾病	标本类型	检出的革兰阴性弯曲杆菌	菌种[b]	显微镜下形态	培养条件及所用培养基	本书章节
胃肠炎	粪便、肠黏膜活检	弓形菌属	巴策尔弓形杆菌（*A. butzleri*） 嗜低温弓形菌（*A. cryaerophilus*） 斯基罗弓形杆菌（*A. skirrowii*）	稍弯曲，弯曲的，"S"形或螺旋形	微需氧；有氧或厌氧条件下均可生长；非溶血性；生长在非选择性的血琼脂（用过滤法），也可生长在Campy-CVA上	58
		短螺族体（*Brachyspira*）	阿尔堡短螺族体（*B. aalborgi*） 多毛短螺族体（*B. pilosicoli*）	螺旋菌	厌氧；在厌氧培养下孵育时间延长（1～2周）；可能需要选择性培养基	62
		弯曲杆菌属	空肠弯曲杆菌空肠亚种 空肠弯曲杆菌多氏亚种（*C. jejuni* subsp. *doylei*） 大肠弯曲杆菌（*C. coli*） 乌普萨拉弯曲杆菌（*C. upsaliensis*） 胎儿弯曲杆菌胎儿亚种（*C. fetus* subsp. *fetus*） 海鸥弯曲杆菌亚种（*C. lari* subsp. *lari/concheus*） 屈曲弯曲杆菌（*C. curvus*） 简明弯曲杆菌（*C. concisus*） 黑岛弯曲杆菌（*C. insulaenigrae*） 直线弯曲杆菌（*C. rectus*） 人弯曲杆菌（*C. hominis*） 屠场弯曲杆菌（*C. lanienae*） 豕肠弯曲菌（*C. hyointestinalis*） 巨蚌弯曲杆菌（*C. peloridis*） 唾液弯曲杆菌（*C. sputorum*）	弯曲、螺旋形，海鸥展翅形，"S"形革兰阴性杆菌	微需氧；37或42℃生长；一些非空肠弯曲菌/大肠弯曲杆菌需要增加氢气浓度；需要选择性培养基，如Campy-CVA和CCDA培养基；过滤方法用于稀有和需求氢的菌种	58
		螺杆菌属		弯曲、螺旋形，海鸥展翅形，"S"形革兰阴性杆菌	微需氧；37℃生长最佳，肠道菌种需要增加氢气浓度；幽门螺杆菌需要非选择性血琼脂；污染的胃液标本可能需要选择性添加（Skirrow's，Dent's）	59

（续　表）

临床疾病	标本类型	检出的革兰阴性弯曲杆菌	菌种[b]	显微镜下形态	培养条件及所用培养基	本书章节
		胃的	幽门螺杆菌 比佐泽罗螺杆菌(*H. bizzozeronii*) 猪螺杆菌(*H. suis*) 海尔曼螺杆菌(*H. heilmannii*)			
		肠内的	胆汁螺杆菌(*H. bilis*) 犬螺杆菌(*H. canis*) 加拿大螺杆菌(*H. canadensis*) 同性恋螺杆菌(*H. cinaedi*) 苏内尔螺杆菌(*H. fenneliae*) 幼禽螺杆菌(*H. pullorum*)			
		弧菌属	霍乱弧菌 副溶血弧菌 河流弧菌 解藻酸弧菌 辛辛那提弧菌 弗尼斯弧菌 梅契尼科夫弧菌 拟态弧菌 霍氏格里蒙特菌 美人鱼发光杆菌	逗点状或直的杆菌，大于弯曲菌属	有氧条件；37℃生长最佳；在常规实验室培养基，血琼脂，麦康凯琼脂生长；初次分离粪便样本使用选择性培养基，如 TCBS	43
菌血症	血	厌氧螺菌属	产琥珀酸厌氧螺菌	和弯曲杆菌属类似呈弯曲、螺旋形，海鸥展翅形	厌氧条件	56
		弓形杆菌属	布氏弓形杆菌 嗜低温弓形杆菌			58
		疏螺旋体属	莱姆群(Lyme group)，阿氏疏螺旋体(*B. afzelii*) 伯氏疏螺旋体(*B. burgdorferi*) 加林疏螺旋体(*B. garinii*) 回归热群(relapsing fever group) 回归热疏螺旋体(*B. recurrentis*) 赫氏脾疏螺旋体(*B. hermsii*) 特氏疏螺旋体((*B. turicatae*)	未见于常规血培养瓶	较难分离；分离需特殊培养基，如：BSK，MKP	61
		弯曲杆菌属	空肠弯曲杆菌空肠亚种 胎儿弯曲杆菌胎儿亚种 乌普萨拉弯曲杆菌 海鸥弯曲杆菌亚种 简明弯曲杆菌	弯曲、螺旋形，海鸥展翅形，"S"形革兰阴性杆菌	微需氧；37℃传代培养；一些非空肠弯曲菌/大肠弯曲杆菌需要增加氢气浓度	58
		草螺菌属(*Herbaspirillum*)	*Herbaspirillum huttiense/aquaticum*	弯曲或螺旋形革兰阴性杆菌	非发酵的革兰阴性菌	45
		螺杆菌属	同性恋螺杆菌 苏内尔螺杆菌	弯曲、螺旋形，海鸥展翅形，"S"形革兰阴性杆菌	微需氧；37℃传代培养；需要增加氢气浓度	59

（续 表）

临床疾病	标本类型	检出的革兰阴性弯曲杆菌	菌种[b]	显微镜下形态	培养条件及所用培养基	本书章节
		钩端螺旋体属	双曲钩端螺旋体（*L. biflexa*） 问号钩端螺旋体（*L. interrogans*）	未见于常规血培养瓶	28～30℃需氧生长；分离需特殊培养基，如 EMJH、PLM-5	60
		弧菌属	创伤弧菌 梅契尼科夫弧菌 辛辛那提弧菌 美人鱼发光杆菌（之前的美人鱼弧菌）	逗点状或直的杆菌	37℃需氧生长；生长在常规的血琼脂、麦康凯琼脂	43
组织感染，口腔	组织活检，脓液	弯曲杆菌属	简明弯曲杆菌 屈曲弯曲杆菌 直肠弯曲杆菌 纤细弯曲杆菌（*C. gracilis*） 昭和弯曲杆菌（*C. showae*） 解脲弯曲杆菌（*C. ureolyticus*）	弯曲、螺旋形，海鸥展翅形，“S”形革兰阴性杆菌	微需氧；37℃传代培养；口腔菌株需增加氢气浓度；使用非选择性血琼脂或过滤法 CCDA	58
组织感染，皮肤、伤口、其他	皮肤活检，组织液	疏螺旋体属	莱姆组	需要组织学染色	较难分离；分离需特殊培养基，例如 BSK、MKP	61
		密螺旋体属	梅毒螺旋体（梅毒）“品他密螺旋体”（*T. carateum*） （品他病） 苍白螺旋体极细亚种（*T. pallidum* subsp. *pertenue*） （雅司病） 苍白螺旋体地方亚种（*T. pallidum* subsp. *endemicum*） （地方性梅毒）	螺旋体（银染，暗视野显微镜，DFA）	尚未在体外成功分离	62
		弧菌	创伤弧菌 解藻酸弧菌 哈氏弧菌 美人鱼发光杆菌（之前的美人鱼弧菌）	逗点状或直的杆菌，大于弯曲菌属	需氧；生长在常规实验室培养基、血琼脂及麦康凯琼脂上	43
		厌氧菌	脱硫弧菌属 沃兹沃思萨特菌 产琥珀酸沃林菌 产琥珀酸厌氧生活螺菌	弯曲棒状	厌氧条件下生长，需使用厌氧培养基	56
		草螺菌属	草螺菌属	弯曲或螺旋形革兰阴性杆菌	非发酵的革兰阴性菌	45
尿微生物	尿	钩端螺旋体属	双曲钩端螺旋体 问号钩端螺旋体	螺旋体带弯曲末端（暗视野显微镜观察）	28～30℃需氧生长；分离需特殊培养基，如 EMJH、PLM-5	60

注：[a]DFA. 直接荧光抗体测定；Campy-CVA. 含头孢哌酮、万古霉素、两性霉素琼脂；CCDA. 炭-头孢哌酮-脱氧胆酸琼脂；TCBS. 硫代硫酸盐-枸橼酸盐-胆盐-蔗糖琼脂；BSK.（Barbour-Stoenner-Kelly）培养基；MKP. 改良 Kelley 培养基；EMJH. Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris 培养基；PLM-5. 螺旋体专用培养基。[b]不是所有列在目录的菌种都已证实导致人类疾病；它们被列出均是由于曾经分离自人类临床标本

第 58 章　弯曲菌属和弓形杆菌属

IRVING NACHAMKIN

（杜鸿　译；许建成　审校）

一、分类

弯曲菌、弓形菌和硫磺单胞菌属为包含在弯曲菌科中的密切相关的 3 个属[1-2]。在弯曲菌科中，弯曲菌属包含 24 个种，弓形菌属包含 21 个种，硫磺单胞菌属包含 8 个种。已有一篇关于弯曲菌比较基因组学方面的综述发表[3]。本书的上一版本中，已经公布了弯曲菌和弓形杆菌一些新的种和亚种，本章其他地方会对它们进行描述。

二、弯曲菌属特点

弯曲菌属是弯曲、"S"形或螺旋状杆菌，菌体直径为 0.2～0.9 μm，长度为 0.5～5.0 μm。偶有菌种如人弯曲菌为直杆形。弯曲菌为无芽胞革兰阴性杆菌，陈旧培养或长期暴露于空气培养可形成球形或球菌形菌体。弯曲菌一般通过菌体一端或两端的单极无鞘鞭毛自主运动，但是有些缺乏鞭毛。弯曲菌通过代谢呼吸，通常微需氧，但也有一些菌株是需氧或厌氧生长。一些微需氧生长的菌种培养时需要增加氢气的浓度为到 5%～7%[4]。空肠弯曲菌空肠亚种、大肠弯曲菌、乌普萨拉弯曲菌、胎儿弯曲菌胎儿亚种是临床实验室中最常分离到的弯曲菌属菌种。

弓形菌属为革兰染色阴性，轻微弯曲、弯曲、"S"形或螺旋形，无芽胞杆菌，菌体直径为 0.2～0.9 μm，长度为 1～3 μm。弓形菌可通过单鞭毛运动。嗜厌氧弓形杆菌无动力[5]。弓形菌在 15℃、25℃ 和 30℃ 微需氧环境下均可生长，在 37～42℃ 时生长各异且生长不需要增加氢气浓度。弓形菌在 30 ℃时为需氧生长，在 35～37℃时为厌氧生长。大多数弓形菌不溶血。斯氏弓形菌（*A. skirrowii*）可有 α 溶血[6]。嗜盐弓形杆菌（*A. halophilus*）是一种专性嗜盐菌，在氯化钠浓度低于 2% 的培养基中生长不佳[7]。布氏弓形杆菌和嗜低温弓形杆菌是临床实验室中最常分离到的两种临床相关的弓形菌属菌种。

最初被分类为营自生生活弯曲菌属的硫化螺旋菌属（*Sulfurospirillum* spp.）为细长弯曲的革兰阴性菌，菌体直径为 0.1～0.5 μm，长度为 1～3 μm。所有的硫化螺旋菌都可以还原硫，其代谢活动各不相同。德莱伊硫化螺旋菌（*S. deleyianum*）为该菌属的标准菌株[8]，这类菌对人类或动物不具有致病性，是从水沉积物中分离到的环境微生物[2]。

三、流行病学和传播

弯曲菌主要导致人畜共患病，各种动物作为弯曲菌的储蓄宿主，也是感染人类的传染源（表 58-1）。除了感染食用动物如家禽、牛、羊、猪等外，弯曲菌也可能出现在家养宠物的身上。对于能够引起牙周病的菌种如简明弯曲菌（*C. concisus*）、直线弯曲菌（*C. rectus*）、屈曲弯曲菌（*C. curvus*）和昭和弯曲菌（*C. showae*），人类是唯一公认的宿主。

表 58-1 弯曲菌和弓形菌储蓄宿主及相关疾病

菌名	人类	牛	羊	猪	野生鸟类	海洋哺乳动物	家禽	甲壳类动物	爬行动物	宠物	啮齿类动物	感染类型[a]（参考文献）
鸟弯曲菌 *C. avium*							X					NR(158)
加拿大弯曲菌 *C. canadensis*					X							NR(158)
大肠弯曲菌 *C. coli*				X	X		X					GI,B(17)
简明弯曲菌 *C. concisus*	X											D,B,IG(32)
C. corcagiensis	X[b]											NR(160)
兔弯曲菌 *C. cuniculorum*										X[c]		NR
屈曲弯曲菌 *C. curvus*	X											D,IG
胎儿弯曲菌胎儿亚种 *C fetus* subsp. *fetus*		X	X						X			B, GI
胎儿弯曲菌性病亚种 *C. Fetus* subsp. *venerealis*		X										B (160)
胎儿弯曲菌龟亚种 *C. fetus* subsp. *testudinum*									X			GI, B, other(30)
C. geochelonis									X			NR(161)
纤细弯曲菌 *C. gracilis*	X											D(42)
瑞士弯曲菌 *C. helveticus*										X		NR(162)
肝脏弯曲菌 *C. hepaticus*							X					NR(163)
人弯曲菌 *C. hominis*	X											D(42)
豕肠弯曲菌豕肠亚种 *C. Hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*		X		X							X	D,B
豕肠弯曲菌劳氏亚种 *C. Hyointestinalis* subsp. *lawsonii*				X	X							NR(32)
C. iguaniorum									X			NR(164)
黑岛弯曲菌 *C. insulaenigrae*						X						GI, B (165)
空肠弯曲菌空肠亚种 *C. jejuni* subsp. *jejuni*	X	X			X		X			X		GI, B (17)
空肠弯曲菌多氏亚种 *C. jejuni* subsp. *doylei*	X											GI, B
屠场弯曲菌 *C. lanienae*		X		X								NR (44)
海鸥弯曲菌贝类亚种 *C. lari* subsp. *concheus*								X				NR (33)

（续　表）

菌名	人类	牛	羊	猪	野生鸟类	海洋哺乳动物	家禽	甲壳类动物	爬行动物	宠物	啮齿类动物	感染类型[a]（参考文献）
海鸥弯曲菌海鸥亚种 *C. lari* subsp. *lari*	X				X					X		GI, B
黏膜弯曲菌 *C. mucosalis*				X								NR
C. ornithocola					X							166
幽门炎弯曲菌 *C. peloridis*	X							X				NR (33)
直肠弯曲菌 *C. rectus*	X											D, GI
昭和弯曲菌 *C. showae*	X											D
唾液弯曲菌类解脲生物变种 *C. sputorum* bv. paraureolyticus		X										GI (167)
唾液弯曲菌唾液变种 *C. sputorum* bv. sputorum	X	X	X	X								B, T (162)
唾液弯曲菌粪生物变种 *C. sputorum* bv. faecalis		X	X									NR
亚南极弯曲菌 *C. subantarcticus*					X							NR (168)
乌普萨拉弯曲菌 *C. upsaliensis*							X			X		GI, B
解脲弯曲菌 *C. ureolyticus*	X											D
鸟类弯曲菌 *C. volucris*					X							NR (169)
嗜厌氧弓形杆菌 *A. anaerophilus*												NR (5)
水生弓形菌 *A. aquimarinus*												170
双壳贝弓形杆菌 *A. bivalviorum*								X				NR (171)
巴策尔弓形菌 *A. butzleri*	X	X		X			X					GI, B, T (55)
食物弓形菌 *A. cibarius*							X					NR (172)
阴沟弓形杆菌 *A. cloacae*								X				NR
嗜低温弓形菌 *A. cryaerophilus*	X	X	X	X			X					GI
污水弓形杆菌 *A. defluvii*												NR (173)
A. ebronensis												170
埃利斯弓形杆菌 *A. ellisii*								X				NR (174)

（续 表）

菌名	人类	牛	羊	猪	野生鸟类	海洋哺乳动物	家禽	甲壳类动物	爬行动物	宠物	啮齿类动物	感染类型[a]（参考文献）
嗜盐弓形菌 *A. halophilus*												NR (7)
A. lanthieri			X	X								NR (175)
A. lekithochrous								X				NR (176)
海洋弓形杆菌 *A. marinus*												NR (177)
软件动物弓形杆菌 *A. molluscorum*								X				NR (178)
贻贝弓形杆菌 *A. mytili*								X				NR (179)
固氮弓形菌 *A. nitrofigilis*												NR
A. pacificus						海水						NR
斯氏弓形菌 *A. skirrowii*	X	X	X	X			X					GI
猪弓形杆菌 *A. suis*				X								NR (180)
动物弓形杆菌 *A. thereius*				X			X					NR (181)
育肥动物弓形杆菌 *A. trophiarum*				X								NR (182)
蛤仔弓形杆菌 *A. venerupis*								X				NR (171)

注：[a] GI. 胃肠道；B. 血液；D. 口腔；T. 软组织；NR. 与人类感染无关。[b] 灵长类动物。[c] 兔子

在发达国家和发展中国家，弯曲菌感染都很普遍。经培养鉴定确证感染的发病率报道在不同国家间差异很大，因为培养操作和报告的要求各不相同，直接比较报道的发病率可能很复杂。在美国，报道感染的程序因州而异，食源性疾病动态监测项目 FoodNet（www.cdc.gov/FoodNet）（食品网）提供了一个统一的网站报道点，给出了准确的实验室确诊感染的发病率。与美国 1996—1998 年的基线相比，2009 年经培养鉴定确证弯曲菌感染的发病率下降了 30%，但随后与 2006 至 2008 年基线相比，2012 的发病率增长了 14%，达到 2000 年以来的最高水平[9]。美国在 2015 年，感染率为 12.82/10 万[10]（范围为 6.23～21.22，包括 10 个 FoodNet 检测点的报告）。尽管在此次对于发病率的评估中并未被采用，一些采用非依赖培养的诊断检测方法对病例的报道及发病率评估的效果在公共健康部中也引起了一些担心[11]。另外关于使用非依赖培养的诊断试验的担心包括缺乏进行流行病学分型及抗菌药物敏感性试验的菌株。空肠弯曲菌空肠亚种（在本章中统称为空肠弯曲菌）仍然是从美国一些州 FoodNet 网站报道的感染患者中可以分离到最常见的肠道病原体，美国估计每年检出 130 万例[12-13]。因为漏诊和漏报，在任何国家实际的发病率都比报道的发病率要高很多。美国的弯曲菌病的发病率已发生变化，但是其流行病学变化并不明显[14]。弯曲菌感染通常是散发的，发病率 3 月份开始上升，夏季最高，初秋开始下降[14]。感染通常是由于摄入了处理或烹饪不当的食物，主要是禽类制品。对来自美国和欧洲的病例进行对照研究，发现食用禽类产品是弯曲菌病发生的重要危险因素[14]。1998— 2004 年，美国大概一半的弯曲菌病疫情和奶制品或水有关，剩下的大多是食源性暴发，其中 44% 是由禽类制品引起[14]。1998—2002 年，64 起食源性弯曲菌病疫情导致 1628 人感染，相比之下，2003—2007 年，暴发 92 次疫情，1431 人感染

致病。在其他发达国家，弯曲菌疫情的暴发也与食物、水或奶制品污染有关[14]。在发展中国家，弯曲菌常常可以从有/无腹泻的患者中分离到。大部分有症状的感染发生在婴儿和儿童早期，发病率随着年龄增长而降低。弯曲菌感染是旅行相关胃肠炎的首要病因[15]。感染的发病率有两次高峰期，婴儿及幼儿时期发病率最高，其次为 20－40 岁的成人[13]。弯曲菌致病的感染菌量不是特别高，低至 500 CFU 即可致病，患者传染给其他人的二次传播罕见[16]。

四、临床意义

(一)空肠弯曲菌和大肠弯曲菌

空肠弯曲菌和大肠弯曲菌作为胃肠道感染的病原菌发现于 20 世纪 70 年代早期。在美国，空肠弯曲菌是细菌性肠炎最常见的病因之一。空肠弯曲菌和大肠弯曲菌仍然是与腹泻相关最常见的弯曲菌菌种，可以引起原因不明的临床感染。大多数实验室通常不区分这两种病原体。由空肠弯曲菌和大肠弯曲菌感染引起的肠胃炎患者，其症状轻重不一，包括发热、腹部绞痛和腹泻等(伴有或无血液/粪便白细胞)，这些症状可以持续几天甚至超过 1 周[17]。一个系统性的回顾发现，弯曲菌感染的潜伏期平均为 2.5～4.3 天，其长短取决于感染细菌的亚组[18]。有症状的感染通常是自限性的，但未经治疗的患者中 5%～10% 可能复发[17]。住院治疗的患者常见弯曲菌感染，根据 2015 年食品网(FoodNet)报道，经实验室确证感染的病例中 17% 是院内感染[10]。弯曲菌感染的症状可能类似于急性阑尾炎发作，可导致不必要的外科手术。弯曲菌除引起肠炎外还可引起肠外感染，包括菌血症、肝炎、胆囊炎、胰腺炎、流产和新生儿败血症、肾炎、前列腺炎、尿路感染、腹膜炎、心肌炎和局部感染(包括脑膜炎、化脓性关节炎和脓肿)[17-19]。研究报道显示菌血症的发生率占肠道感染者的 1.5‰，老年人发病率最高[20]。免疫力低下者可能发生持续性腹泻和菌血症，如患者伴有人类免疫缺陷病毒感染，便难以治疗[17]。由空肠弯曲菌感染导致的死亡不常见[9,17]。弯曲菌引起的健康问题是否确实存在，还未被很好地认识[21]。

大多数人认为空肠弯曲菌感染是吉兰-巴雷综合征(Guillain-Barre syndrome，GBS)(一种急性周围神经系统麻痹性疾病)的病因[22]。在一些 GBS 病例中，常出现某些耐热(heat-stable，HS)血清型，如 HS:19 和 HS:41，但其他更常见的血清型也经常被报道[22]。弯曲菌引起 GBS 的发病机制涉及宿主对存在脂多糖核心区域的神经节苷脂样表位抗原的免疫反应[23]，在易感人群中导致神经节苷脂高度富集的周围神经损伤[24]。

反应性关节炎有时伴随弯曲菌的感染，出现疼痛和关节肿胀可以持续数周到近一年，平均为 2 周。莱特尔综合征也可能在一些患者中出现[17]。目前已知肠易激综合征(irratable bowel syndrome，IBS)是弯曲菌感染的后遗症之一[25]。

弯曲菌引起肠道感染的致病机制还知之甚少。弯曲菌最小致病量还不清楚，但低至 500 个病原体也许就能够致病[17]。质子泵抑制剂的使用可以增加弯曲菌感染的易感性[26]。感染的症状和体征可提示疾病的侵袭过程。多种重要的致病因素可能参与空肠弯曲菌感染，包括对肠道黏膜的黏附力、细菌对细胞的影响和机体的炎症反应[27]。

(二)空肠弯曲菌和大肠弯曲菌以外的弯曲菌

通过改进空肠弯曲菌和大肠弯曲菌的主要培养方法，空肠弯曲菌和大肠弯曲菌以外的弯曲菌被越来越多地分离到。本章节中仅讨论从人体标本中分离得到的菌种，而已知的弯曲菌种的完整列表详见表 58-1 和表 58-2。

胎儿弯曲菌在妊娠期和抵抗力低下者中主要与菌血症和肠外感染有关[28]。虽然该病原体也会引起胃肠炎，但由于在 42℃时生长不佳，且通常对头孢菌素和一些常规用于分离培养粪便标本的选择性培养基的抗菌药物敏感，因此可能导致对其发病率估计过低[29]。胎儿弯曲菌性病亚种是引起牛性传播弯曲菌病和牛不孕的一个原因，但很少造成人类感染[28]。胎儿弯曲菌龟亚种是一个新的亚种，已从人类和爬行动物(蜥蜴)中分离得到，它与胎儿弯曲菌胎儿亚种及性病亚种可通过基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术进行区分[30-31]。

表 58-2 弯曲菌属和弓形菌属常用的表型特征[a]

病原体	触酶	H_2需求	脲酶	H_2S(TSI)	马尿酸盐水解反应	吲哚酚乙酸盐水解	芳基硫酸酯酶	亚硒酸盐还原反应	生长于1%甘氨酸	生长于25℃	需氧生长
已知或假定具临床意义的常见菌种											
空肠弯曲菌空肠亚种	+	−	−	−	+	+	v	v	+	−	−
空肠弯曲菌多氏亚种	v	−	−	−	v	+	−	−	+	−	−
大肠弯曲菌	+	−	−	v	−	+	−	+	+	−	−
胎儿弯曲菌胎儿亚种	+	−	−	−	−	−	−	v	+	+	−
海鸥弯曲菌海鸥亚种/海鸥弯曲菌贝类亚种[b]	+	−	v	−	−	−	−	v	+	−	−
乌普萨拉弯曲菌	−	−	−	−	−	+	−	+	+	−	−
罕见菌种											
乌弯曲菌	v	v	−	−	+	+	ND	−	−	−	−
加拿大弯曲菌	v	−	v	v	−	−	ND	ND	v	−	−
简明弯曲菌	−	+	−	v	−	−	+	v	v	−	−
兔弯曲菌	+	−	−	−	−	+	ND	−	−	−	−
屈曲弯曲菌	−	+	−	v	v	v	+	−	+	−	−
胎儿弯曲菌性病亚种纤细弯曲菌	v	−	−	−	−	−	−	v	v	+	−
瑞士弯曲菌	−	−	−	−	−	+	ND	−	v	−	−
人弯曲菌	−	+[c]	ND	−	−	−	ND	−	+	−	−
豕肠弯曲菌豕肠亚种	+	v	−	+	−	−	−	+	+	v	−
豕肠弯曲菌劳氏亚种	+	v	+	+[d]	−	−	−	+	v	−	−
黑岛弯曲菌	+	−	−	−	−	−	ND	ND	+	−	−
屠场弯曲菌	+	−	−	−	−	−	ND	+	V	−	−
黏膜弯曲菌	−	+	−	+	−	−	−	V	V	−	−
幽门炎弯曲菌	+	ND	ND	ND	−	ND	ND	ND	+	ND	ND
直肠弯曲菌	V	+	−	−	−	+	+	−	+	−	−
昭和弯曲菌	+	+	−	−	−	V	+	−	V	−	−
唾液弯曲菌[d]唾液亚种	−	+	−	+	−	−	+	V	+	−	−
唾液弯曲菌粪生物变种	+	+	−	+	−	−	+	V	+	−	−
唾液弯曲菌类解脲生物变种	−	+	+	+	−	−	+	V	+	−	−

（续 表）

病原体	触酶	H_2需求	脲酶	H_2S(TSI)	马尿酸盐水解反应	吲哚酚乙酸盐水解	芳基硫酸酯酶	亚硒酸盐还原反应	生长于 1% 甘氨酸	生长于 25℃	需氧生长
解脲弯曲菌	V	+	+	−	−	−	ND	−	+	−	−
亚南极弯曲菌	+	−	−	−	−	−	ND	−	V	−	−
膀胱弯曲菌	+	−	+	−	−	ND	ND	ND	ND	+	−
食物弓形菌	V	−	−	−	−	+	ND	−	−	+	V
嗜低温弓形菌	V	−	−	−	−	+	−	−	V	+	+
布氏弓形菌	V	−	−	−	−	+	−	−	+	V	+
贻贝弓形杆菌	+	−	+	+	−	−	ND	ND	ND	+	+
固氮弓形菌	+	−	−	−	−	+	−	ND	−	ND	ND
斯氏弓形菌	+	−	−	−	−	+	−	ND	V	+	+
动物弓形杆菌	+	−	−	−	−	+	−	−	+	+	+

注：[a] 改编自参考文献[33][51][110][159][168][179]和[183]。+. 阳性反应；−. 阴性反应；V. 可变反应；ND. 未定义；TSI. 三糖离子。[b] 海鸥弯曲菌贝类亚种能够通过在含 0.05% 番红精培养基中不生长的特性与海鸥弯曲菌海鸥亚种区分[37]。[c] 只能厌氧生长。[d] 唾液弯曲菌和豕肠弯曲菌劳氏亚种在 TSI 琼脂中一般能产生大量的 H_2S

海鸥弯曲菌是一种对萘啶酸天然耐药的嗜热菌，从海鸥中首次分离，并可在其他鸟类、狗、猫和鸡中分离到。从菌血症、胃肠炎和泌尿系统感染的患者分离到该病原体的报道很少[32]。最近的系统发育研究发现有贝类和海鸥2个亚种[33]。在两个多重肠胃道致病菌检测试剂盒中（Luminex xTAG GPP，Verigene），都包含了对海鸥弯曲菌的检测。

乌普萨拉弯曲菌是一种耐热型细菌，可引起人类腹泻和菌血症，也与犬和猫的肠胃炎有关[32]。在比利时一家微生物参考实验室中，超过七年的研究发现，乌普萨拉弯曲菌是送检培养的粪便标本中最常分离到的非空肠、非大肠弯曲菌的菌种[34]。乌普萨拉弯曲菌对空肠弯曲菌选择培养基中许多抗菌药物敏感，因此常规培养基一般不用于分离该菌，可以通过后续章节中介绍的过滤技术来进行分离。在一个新的多重肠胃道致病菌检测试剂盒中（FilmArray），包含对乌普萨拉弯曲菌的检测。

从多种疾病的临床标本可分离到其他弯曲菌种，但其致病作用尚不明确[32]。空肠弯曲菌德莱亚种是硝酸盐阴性的空肠弯曲菌亚种，极少从上消化道感染和胃肠炎患者中分离到[32]。巨蚌弯曲菌已从人类粪便、透析液及贝类中分离得到[33]。简明弯曲菌可以从粪便和血液标本中分离到。有报道称这种病原体与胃肠道疾病有关，但需要附加对照病例以确定该菌的致病性[35-37]。屈曲弯曲菌也已从牙周炎、肝脓肿及肺炎患者中分离得到[38]。有人提出屈曲弯曲菌可能是导致腹泻的一个病因[39]，但是另一个大型研究表明屈曲弯曲菌很少从粪便样本中分离到[40]。纤细弯曲菌已从阑尾炎、腹膜炎、菌血症、软组织脓肿和肺部感染患者中分离到[41]。人弯曲菌已分离自健康人的粪便样本，并且可为口腔共生菌[42]。猪肠弯曲菌偶尔可引起人类直肠炎和腹泻[43]。屠宰场弯曲菌曾从2名无症状的屠宰场工人和1名院内发热伴腹泻的患者身上分离到，但其临床意义尚不明确[44-45]。据报道，黏膜弯曲菌已分离自两名患肠炎的儿童，但随后试验发现该病原体其实为简明弯曲菌[46]。直线弯曲菌主要从活动性牙周感染患者中分离到，但也已有报道肺部感染[32,47]和乳腺囊肿患者[38]可分离到该菌。唾液弯曲菌与肺、腋窝、阴囊、腹股沟的脓肿有关[32]。唾液弯曲菌类解脲生物变种，以前称为触酶阴性、脲酶阳性的弯曲菌，已从腹泻患者中分离到，但是该病原体发现的意义还不清楚[48]。昭和弯曲菌已从人类牙龈缝隙中分离到[49]，也曾于1例胆囊炎患者的血培养中分离到[50]。膀胱弯曲菌（*Campylobacter blaseri*）是一个即将提议被命名的新种，它与解脲弯曲菌亲缘关系最接近，曾经从荷兰斑海豹身上分离到，但是作为引起人类感染的病原体还有待描述[51]。

(三)弓形菌

弓形菌（Arcobacter）为耐氧、弯曲菌样的微生物，常常能从牛、羊、猪、禽、鸟各种动物来源及其他来源的标本中分离得到[52-53]。18种弓形菌的其中两个种可以导致人类感染。布氏弓形菌可从菌血症、心内膜炎、腹膜炎和腹泻患者中分离到，最近通过分子检测方法，确定该病原体为威斯康辛州食物中毒的病原菌[32,34,54]。嗜低温弓形虫之前被分为1A和1B两个DNA相关的群[55]。嗜低温弓形虫的1B群可从菌血症和腹泻患者中分离到[32,34]，也可作为正常菌群在健康人中分离到[56]。嗜低温弓形虫的1A群可从动物中分离到[55]。Vandenberg等[34]报道布氏弓形菌是从腹泻患者分离到的第四位常见病原菌，也是过去10年内从73 000份粪便标本中分离到的最常见的非空肠弯曲菌和非大肠弯曲菌的病原体之一[57]。因此，如果没有采用合适的培养条件，布氏弓形菌可能不容易被鉴定出来。对法国2855份疑似弯曲菌分离物进行实验室鉴定，发现只有1%的腹泻患者的粪便标本中可鉴定出布氏弓形菌[58]。斯氏弓形虫曾从一例慢性腹泻患者的粪便标本中分离到，但是该病原体在人类疾病中的作用还不清楚[59]。从2010年起新发现的10个菌种均与人类疾病无关。

五、样本的采集、运输和储存

(一)粪便标本

弯曲菌最好从年龄较大的儿童和患有胃肠道感染的成年患者的粪便标本中分离，婴幼儿可采用肛拭子分离培养[60-61]。对于住院患者，“三天”原则（拒绝接受入院72 h以后采集的排泄物标本）作为常规培养的标准[62-63]。常规培养时单份粪便标本对分离常见的肠道致病菌敏感性很

高[64-65]，但是双份标本送检结果更准确，这取决于临床或检验前处理情况，如标本送检延迟超过 2 h 将影响分离培养的结果[56]。如预计粪便标本送至实验室时间超过 2 h 或转送肛拭子时应用诸如 Cary-Blair 或 Fecal Enteric Plus 之类的转运培养基[66]。含低浓度琼脂(1.6 g/L)的改良 Cary-Blair 培养基是弯曲菌最合适的转运培养基，也可用于其他的肠道致病菌。如果不能及时进行标本处理，接种于 Cary-Blair 培养基的标本应该在 4℃ 下保存。添加羊血的 Cary-Blair 培养基可延长粪便标本的存放时间，提高空肠弯曲菌的分离率[67]。因此，无防腐剂或在错误防腐剂中过长时间转运，成形便、混有尿或有混入钡剂迹象，以及干燥的肛拭子和未取到样的标本均应拒收。

(二)血液

已从血液标本分离到的弯曲菌类主要是胎儿弯曲菌、空肠弯曲菌和乌普萨拉弯曲菌。然而，只有少数应用最佳条件从血培养分离到弯曲菌的研究予以了证实。BACTEC 系统[68]和 Septi-Chek 系统(BD, Sparks, MD)均适于常见弯曲菌的培养[69-70]。BacT/Alert 系统(bioMérieux, Inc)也适用于胎儿弯曲菌的培养[71]。Louwen 等[72]发表了一篇关于弯曲菌血症的综述。

六、直接检查

(一)镜检

临床工作中，对于细菌性肠胃炎患者的粪便标本常规不进行革兰染色，但疑似弯曲菌感染时，则为快速而敏感的方法。弯曲菌于革兰染色时使用沙黄复染后镜下不易观察，比其他革兰阴性肠道细菌颜色略浅。在粪便或纯培养物涂片染色时应该用石炭酸品红或 0.1% 碱性品红水溶液作为复染剂[73]。由于显微镜下的形态学特征，对于患活动性肠炎患者的粪便标本，直接革兰染色检查的敏感性可达 66%～94%，且特异性达 95% 以上[74]。相差显微镜和暗视野显微镜也被用来直接检查新鲜粪便标本中活的弯曲菌，然而，这些方法的检测敏感性尚无太多研究，故我们建议对显微镜非常有经验的专家才能进行此项形态学检查。一些粪便中的标志物也已用作胃肠道感染相关炎症的间接筛检。这些标志物包括粪便中白细胞、粪乳铁蛋白及粪钙卫蛋白的检测。这些检测的性能特征，并不足以推荐将这些检查作为筛查胃肠道感染的常规检查项目[75]。

(二)抗原检查

在美国，几个用于检测粪便标本中弯曲菌的商品化抗原检测系统已获 FDA 批准，如 ProSpecT 弯曲菌分析盒(ThermoFisher Scientific)、Premier Campy 弯曲菌分析盒(MeridianBiosciences)和 ImmunoCard STAT! CAMPY 检测弯曲菌分析盒(Meridian Biosciences)。尽管未设计期望研究或仅检测了少量样本，亦或存在选样偏倚(例如，刻意增加阳性标本)，先前的一些研究表明，弯曲菌菌种抗原免疫分析具有很好的性能特征[76-78]。另一些研究也质疑了粪便抗原检测的准确性[79-82]。在对这些免疫分析的广泛评估中，通过研究数百份粪便标本，Fitzgerald 等[83]发现，这些分析敏感性相对较低且阳性预测值差，认为它们不应作为独立诊断胃肠道弯曲菌感染的检测。其他在美国之外开展的酶免疫分析性能各异[84]。阳性的免疫分析结果推荐应通过附加检测，培养或核酸扩增加以确认，抑或按照制造商说明书的要求加以确认。

(三)核酸检测

核酸扩增检测(nucleic acid amplification tests, NAATs)现在被广泛用于直接检测粪便标本中的弯曲菌以及其他肠道病原体。利用分子技术直接检测粪便标本中的弯曲菌可以缩短检测的时间，提高鉴定菌种的水平，以及检出传统培养检测漏检的不常见弯曲菌。大量实验室开发的检测方法已进行评估并运用，包括检测空肠弯曲菌以及大肠弯曲菌(和其他弯曲菌种)特异性靶基因的实时 PCR 技术，以及 16sRNA 基因测序技术[85-87]。

截至本文撰写，FDA 已批准了五种商品化的多重核酸扩增检测系统用于直接检测粪便标本中的弯曲菌。这些系统包括：Prodesse ProGastro SSCS 试剂盒[沙门菌属、志贺菌属、弯曲杆菌属和产志贺毒素大肠杆菌(STEC)](HologicInc., Gen-Prodesse, Waukesha, WI)[88]、Luminex xTAG GPP 试剂盒(胃肠道病原体组)(Luminex; Molecular Diagnostics, Toronto, CA)[89]、BD Max 肠道

细菌组试剂盒[90-91]、肠致病菌试验试剂盒(Luminex Corp.)[89],以及 FilmArray 胃肠组试剂盒(Biofire; bioMérieux Co.)[89,92]。这些试剂盒使用了各种方法同时检测弯曲菌和诸如沙门菌、志贺菌、STEC、弧菌某些种、小肠结肠炎耶尔森菌、邻单胞菌、艰难梭菌等肠道致病菌,以及肠道原虫和诸如病毒、轮状病毒等肠道病毒。这些检测分析对于分析平台、手工时间,以及实验室工作流程要求各不相同。相较于培养方法,高敏感性的分析技术正越来越多地用作诊断弯曲菌感染的主要诊断工具(各分析系统性能特征见表 58-3)。在粪便标本中使用核酸扩增检测检测弯曲菌还面临一些挑战。检验性能验证,尤其是当得到不一致的结果(例如,核酸扩增检测检测阳性但培养阴性)时,对某些实验室而言,就是挑战。基于检测平台的不同,合格的标本类型各异,需要进行额外的验证试验研究。如有必要时,如何选择重复试验的恰当时机,以及抗菌药物治疗对于检测结果的影响仍需要额外的研究。最后,这些相关的更新的检测平台也许耗资巨大。

表 58-3 FDA 宣布用于检测粪便中弯曲菌的核酸扩增检测法的性能特征

检测方法	公司	检测目标	敏感性a(%)(95%CIb)	特异性c(%)(95%CI)
Prodesse ProGastro SSCS	Hologic GenProbe, San Diego, CA	空肠弯曲菌 *glyA* 基因 大肠弯曲菌 *acdF* 基因	100(63~100)	97.6(95~99)
Luminex xTAG GPP	Luminex Molecular Diagnostics, Austin, TX	空肠弯曲菌 大肠弯曲菌 海鸥弯曲菌	91.7(61.5~99.8)	100(97.4~100)
Verigene EP	LuminexMolecular Diagnostics, Austin, TX	空肠弯曲菌 大肠弯曲菌 海鸥弯曲菌	83.3 (52.0~97.9)	99.3 (96.1~100)
Film Array GP	BioFire Diagnostics, bioMérieux, Salt Lake City, UT	空肠弯曲菌	100 (73.5~100)	100 (97.4~100)
		大肠弯曲菌	100 (73.5~100)	100 (73.5~100)
		乌普萨拉弯曲菌	97.1(85.1~99.9)	98.4 (97.7~99)
BD Max EB	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ	空肠弯曲菌	97.0(95.9~98.1)	98.0(97.1~98.9)
		大肠弯曲菌	97.0(95.9~98.1)	98.0(97.1~98.9)
		tuf 基因	97.5(94.3~99.2)	99.0(98.6~99.3)

a. 阳性一致的百分比;b. CI, 置信区间;c. 阴性一致的百分比

七、分离步骤

诸如空肠弯曲菌、大肠弯曲菌及胎儿弯曲菌之类的普通弯曲菌需要将标本置于 5% O_2、10% CO_2 和 85% N_2 气体的微需氧环境中培养以获得最佳分离培养效果。数种能产生微含氧的产气袋或孵育器,可吸附并替换相似混合气体的厌氧罐也可用于常规分离培养。Anoxomat(Mart 微生物学,Advanced Instruments 经销)是一种简便的自动化排空及替换气体以用于产生包括微需氧等不同气体条件的装置[93]。烛缸法所产生的氧气浓度条件,并非为分离弯曲菌可接受的最佳条件,故在实验室常规分离流程中不应使用这些产气罐。

一些弯曲菌,如简明弯曲菌、屈曲弯曲菌、猪小肠炎弯曲菌、黏膜弯曲菌、直线弯曲菌和唾液弯曲菌,在首次分离培养和生长时需要增加氢气浓度[34,94]。由于常规使用的商品气体发生包产生的氢气浓度小于 2%,这些菌在常规微需氧条件下可能分离不到,因此建议供应商研发一种能产生适用于这些弯曲菌培养所需氢气浓度的产气袋。无催化剂产生高浓度氢气的厌氧气体发生包在实验室会产生安全隐患,因而应禁用。排空替换气体条中含有 10% CO_2、6% H_2 和合适浓度 N_2 的混合气体最适合这些需氢菌种的分离培养。

首先应该选用选择性培养基来分离培养初次接种粪便标本中的空肠弯曲菌和大肠弯曲菌。很多含血和无血的选择性培养基已经商品化。这些产品包括:Campy-CVA 培养基(含头孢哌酮、万古霉素和两性霉素),活性炭-头孢哌酮-去氧胆酸钠-

琼脂培养基(charcoal cefoperazone deoxycholate agar,CCDA)和碳基质选择培养基(charcoal-based selective medium,CSM)。CCDA培养基和CSM培养基的性能特征优于诸如Butzler、Skirrow及Campy BAP之类的含血培养基[40,95-99]。在理想条件下,在粪便标本中应使用2种培养基(如CCDA和CVA)分离弯曲菌,该方法已在多个临床研究中得以确证[83,100]。实际工作中,大多数实验室只使用一种选择培养基用于常规培养。值得注意的是,相较于选用两种培养基,使用单一培养基进行常规培养,分离率下降了10%～15%。作为单一培养基,相较于Skirrow培养基,含头孢哌酮、两性霉素、替考拉宁的培养基,以及过滤法,CCDA培养基分离空肠弯曲菌、大肠弯曲菌的敏感性最高[40]。如果只选用一种培养基,建议使用Campy-CVA培养基,CCDA培养基或CSM培养基。几项使用人类粪便标本的研究中,已描述并评估了采用显色培养基分离弯曲菌的方法[101-102]。

含头孢哌酮、两性霉素和替考拉宁的碳基质培养基是作为初次分离乌普萨拉弯曲菌的选择培养基[103]。但是有两项研究使用该培养基并未从任何粪便标本中分离到乌普萨拉弯曲菌[40,104]。乌普萨拉弯曲菌可以在其他选择性培养基中偶然分离到。使用过滤法也能分离到乌普萨拉弯曲菌,且某些菌株在氢气含量高的环境中生长更好[32,105]。

弯曲菌属和弓形菌属中的菌种有不同的最适生长温度。在决定需要分离菌种的菌谱时,常规粪便培养的孵育温度选择至关重要。通常情况下,大多数实验室选择42℃作为初次分离弯曲菌的孵育温度。在该温度下,空肠弯曲菌、大肠弯曲菌在选择培养基上可以生长,同时可以抑制其他粪菌群生长。乌普萨拉弯曲菌在42℃生长良好但通常在选择培养基上却不能分离到。胎儿弯曲菌在该温度下生长各异,很可能无法分离到。弓形杆菌属的菌种在42℃通常无法分离到。

相反,大多数弯曲菌属和弓形杆菌属的菌种在37℃生长良好。尽管如此,诸如Skirrow之类设计用于42℃的选择培养基,在使用37℃作为孵育温度从粪便标本中分离弯曲菌时,并不推荐使用这些培养基。而CCDA和CSM培养基在37℃时表现出良好的选择性[100]。在报告阴性结果之前,平板至少需要续孵72 h。有报道称,相较于孵育2天,将CCDA培养基孵育5～6天能增加空肠弯曲菌和大肠弯曲菌的分离率[40]。

如果采血后,怀疑弯曲菌感染,血液培养基在培养24～48 h后应传代至非选择性血琼脂培养基上并且将平板置于37℃微需氧环境下续孵,最好再增加氢气含量。这样能分离到嗜热的和非嗜热的菌种。常规使用的血培养系统应能支持弯曲菌的生长并在报阳以后能给予适当的信号,应该谨慎使用盲目的转接培养。同样的,将血液采集到Isolator(Alere,Orlando,FL)管中进行细菌培养时,如果怀疑有弯曲菌感染,需要将Isolator管接种于非选择性的血琼脂平板上,并置于37℃微需氧环境下孵育。一旦血培养阳性瓶涂片革兰染色观察到弯曲的革兰阴性杆菌,样本应在非选择性的血琼脂平板上进行培养,并且置于37℃微需氧环境下继续孵育。如果革兰染色阴性,选择诸如吖啶橙染色法的其他可选染色法,也可检测血培养瓶中的弯曲菌。如果在血培养物中革兰染色检查结果阴性,也可应用如吖啶橙等替代的染色方法再检查。

从临床标本中分离弓形菌的最佳条件尚未确定。首次分离的弓形菌来自培养钩端螺旋体的半固体培养基。弓形菌耐氧,可用特定的选择性培养基分离培养,如Campy-CVA培养基[106],在37℃下微需氧培养;也可用过滤法接种在非选择性培养基上培养[34]。Houf和Stephan[56]对利用选择性培养基分离弓形菌进行了评价。选择性培养基和含有5-氟尿嘧啶、两性霉素B、头孢哌酮、新生霉素和甲氧苄啶的增菌肉汤都能很好地分离培养弓形菌[56]。

(一)增菌培养

增菌肉汤培养基可以提高从粪便标本中分离弯曲菌的分离率,包括Preston增菌培养基、弯曲菌巯基乙酸培养基(Campy-thio)和弯曲菌增菌肉汤培养基。关于增菌培养作为常规粪便培养方法的临床优势及经济性都尚未进行充分的研究,因此增菌培养不建议用于常规培养。尽管如此,从来自于使用分子方法或其他非培养依赖型诊断性检测法(culture-independent diagnostic tests,CIDTs)检测的阳性临床标本中分离弯曲菌时,增菌培养在对照培养的操作规程中有用。

(二)过滤

过滤技术作为筛选培养基和直接培养方法的补充，用于分离对大多数选择性培养基中抗生素敏感的空肠弯曲菌和大肠弯曲菌及其他弯曲菌和弓形菌[34,40,55,57]。每毫升粪便标本中弯曲菌的菌落形成单元(colony-forming unit，CFU)达约 10^5 适合用过滤法检查，过滤法检查不应作为直接培养的替代方法，因为过滤法在首次培养中的敏感性并不如选择性培养基[94,105]。

这种方法主要是基于在短时间内弯曲菌(由于它们细小又有动力)能够相对容易通过滤膜(孔径为 0.45～0.65 μm)，而粪便中其他的病原菌被滞留在膜上。研究表明，推荐使用孔径为 0.65 μm 大小的聚碳酸酯滤器，它优于醋酸纤维膜滤器[94,107]。过滤法是将消毒灭菌后的孔径为 0.65 μm 的聚碳酸酯滤器置于琼脂培养基(如无抗生素的 CCDA、CSM 或血琼脂培养基)的表面，将 1 g 粪便用 10 ml 灭菌生理盐水稀释后或直接从运送培养基中稀释，取 10～15 滴粪便悬液滴于滤器上，平板在大气环境下 37℃ 孵育 60 min[94]。移去滤膜，将平板置于微需氧下，37℃孵育，对于需要氢气的菌株最好增加氢气的含量。

由于初次进行弯曲菌分离试验需消耗多种培养基和滤膜，检查急性细菌性胃肠炎患者时，进行嗜热型弯曲菌分离培养多用单一的培养基，例如 Campy-CVA、CCDA 或 CSM，42℃ 孵育。如果初次培养检查没有取得阳性结果，而患者持续性腹泻时，应分离培养非空肠弯曲菌和非大肠弯曲菌。额外的粪便标本接种于多种选择性培养基(如 CCDA 或 CVA)，也可以使用过滤法，在增加氢气含量的微需氧条件下，37℃孵育。

(三)对照培养

尽管在粪便标本中，使用 CIDT 来检测弯曲菌具有很多优点，但是对采用这些方法作为实验室常规检测的关注也日渐凸显。实验室依然需要具备对 CIDT 阳性标本开展培养的能力(或使用参考实验室)。培养法对于获得药敏信息来对患者加以处理和提交菌株给当地和国家公共卫生实验室以监测暴发流行是不可或缺的，同时，它也可能是 CIDT 厂商说明书中要求的内容[108-109]。

八、鉴 定

由于弯曲菌复杂和快速的分类进化，以及生长条件的苛刻和生化的惰性(表 58-2)，鉴定弯曲菌有难度。因而发展出了应用表型和基因分型方法来鉴别弯曲菌[110]。

(一)弯曲菌和弓形菌

根据所使用的培养基，弯曲菌可形成不同的菌落形态。一般情况下，弯曲菌产生灰色、扁平、不规则、扩展型菌落，尤其是在新配制的培养基上，常其沿接种线扩散生长。由于水分丢失，菌落可能变成圆形、凸起、光滑，并且很少扩散。因此，正确保存培养基以保证水分充足对于更好地分离和鉴定弯曲菌非常重要。弯曲菌在血平板上不溶血。弓形菌在形态学上与弯曲菌类似[2,6]。

弓形菌的革兰染色结果有别于典型的弯曲菌。布氏弓形菌仅有一点弯曲，但嗜低温弓形菌比弯曲菌更为螺旋。用于鉴定弯曲菌的商品化产品的准确性没有比传统的方法更好[111]。不幸的是，表型检测很难区分弯曲菌和弓形菌。微需氧条件下，在麦康凯琼脂培养基上生长的耐氧型(在有氧条件下生长)菌株可倾向于鉴定为弓形菌，但不能在麦康凯琼脂培养基上生长时也不能排除弓形菌的可能。

(二)空肠弯曲菌和大肠弯曲菌

初步分析时，应结合氧化酶试验对菌落进行革兰染色检查。在微需氧环境下、42℃条件的选择培养基下，氧化酶阳性并且革兰染色阴性，弯曲或"S"形杆菌，便可报告为弯曲菌。空肠弯曲菌作为最常见菌种，利用表型检测较易鉴定出来，马尿酸盐水解试验是鉴别空肠弯曲菌(空肠弯曲菌德莱亚种)和其他弯曲菌的主要方法。在选择性培养基上 42℃下生长，氧化酶阳性，具有典型形态学特征，且马尿酸盐水解试验阳性，便可报告为空肠弯曲菌。就常规的临床诊断而言，其他的检测不需进行，这些检测方法在其他章节进行介绍[112]。偶有空肠弯曲菌马尿酸盐水解试验阴性，不易鉴定。MALDI-TOF 质谱法、16S rRNA 测序或其他基因特异性 PCR 分析(如检测 *hipO* 基因)也能用于明确鉴定[113-115]。

除了大肠弯曲菌没有马尿酸酶活性，大肠弯曲菌和空肠弯曲菌的其他生化反应相似（表 58-2）。因此，可应用分子或蛋白检测方法将大肠弯曲菌与马尿酸盐水解试验阴性的空肠弯曲菌相鉴别，这些方法既准确又敏感[116]。MALDI-TOF 质谱法已可以准确区分空肠弯曲菌和大肠弯曲菌[117]。当使用选择培养基且菌落生长小于 48 h 时，使用 MALDI-TOF 质谱法直接鉴定是很准确的。但使用培养时间过长的菌落，检测准确度下降，此时需要进行传代培养[114]。如果不能进行分子检测，则在 42℃下用选择性培养基分离培养到的菌株，氧化酶阳性，具有典型形态学特征，且马尿酸水解试验阴性及吲哚酚乙酸盐（indoxyl acetate）水解试验阳性，即可报告为马尿酸试验阴性的空肠弯曲菌或大肠弯曲菌。另外，大肠弯曲菌和肠胃炎螺杆菌具有相似的表型特型，可用分子方法区分它们[118]。弯曲菌对萘啶酸和头孢菌素的耐药性曾用于菌种鉴定的辅助试验。然而，随着氟喹诺酮类药物耐药率在这些细菌中的快速流行，纸片法药敏试验结果由于准确性低，不再用于辅助鉴定。

（三）除空肠、大肠弯曲菌外的其他弯曲菌

对于空肠弯曲菌以外的弯曲菌，仅凭表型特征不足以作出种水平的鉴定，推荐进行附加的分子鉴定或质谱鉴定法。因为弯曲菌和弓形菌的很多种仅通过表型检测无法鉴定区别，故宜用 PCR 检测病原体种特异性序列。16S 和 23S rRNA 序列被广泛用于属和种的检测，基于这些目的序列的 PCR 检测已用来区分弯曲菌[98]和弓形菌菌种[119-120]。包括对 16S 和 23S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增片段的限制性酶切分析等宽范围的分子鉴定方法已用于弯曲菌和弓形菌菌种的鉴定[121-123]。

许多其他的靶基因已被用于种特异性的 PCR 检测，包括 *gyrA* 基因、*glyA* 基因、*ceuE* 基因、*asp* 基因、*lpxA* 基因和 GTP 酶基因[110]。也可用 PCR 对胎儿弯曲菌亚种和空肠弯曲菌亚种进行鉴定[110]。PCR 检测具有快速、易操作和成本低、高通量等优点，也可以自动化，在应用 PCR 检测之前，验证其特异性和敏感性非常重要。比对 16S rRNA 基因序列也可用于将弯曲菌某些种和相近病原体如弓形菌和螺杆菌等进行鉴别。然而，重要的是，应该注意到基于 16S 在种水平进行鉴定是非常有难度的，特别是鉴定弯曲菌的常见菌种。基于 16S rRNA 基因的序列分析方法鉴定一些相似菌种，如空肠弯曲菌、大肠弯曲菌、海鸥弯曲菌、乌普萨拉弯曲菌、瑞士弯曲菌、胎儿弯曲菌、猪弯曲菌和屠宰场弯曲菌，其中 97% 或以上的比对符合率仍不能保证可以把这些菌种区分开[124]。相反的，种内 16S rRNA 基因多样性在其他菌种如猪肠弯曲菌亦能看到[125]。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）也可鉴定常见和罕见的弯曲菌，并且正被临床实验室常规应用于常见弯曲菌的鉴定。在对将近 1000 株分离株的研究中，MALDI-TOF 质谱仪（MALDI Biotyper，Bruker Daltronics）鉴定空肠弯曲菌准确率为 99.4%，鉴定大肠弯曲菌、胎儿弯曲菌、海鸥弯曲菌及巴策尔弓形杆菌的准确率为 100%[115]。其他的研究也肯定了 MALDI-TOF 质谱仪在鉴定弯曲菌中的价值[113,126]。弯曲菌需在最佳条件下培养以确保质谱分析的成功进行[114]。

九、分型系统

弯曲菌流行病学分型体系复杂多样，不同方法区分菌株之间的能力也有差异。常用的分型方法包括：生物学分型、噬菌体分型和血清学分型[127-128]。HS Penner 血清分型方法能检测空肠弯曲菌和大肠弯曲菌的 60 个血清型。起初认为脂多糖是其检测的抗原决定簇，但 HS 方法实际检测的是弯曲菌的荚膜多糖[129]。由于耗时长、花费高以维持优质抗血清，故血清学分型（serotyping，HS）世界范围内只在一些参考实验室进行。一种血清学分型试剂盒（Denka Seiken USA，Inc.，Camp-bell，CA）已商品化。传统的血清学分型虽然用得很少，但有助于诊断弯曲菌相关的疾病和 GBS。生物分型和噬菌体分型等其他分型系统在现代流行病学研究方面还没有任何实际的应用。特别是最近，应用多重 PCR 进行的荚膜分型已经被研发出来，其与传统 HS 血清学分型相关性极好[130-132]。

基于表型的亚型分型方法的不足和 90 年代分子生物学技术的快速发展导致了一系列分子亚型分型方法的建立，如限制性核酸内切酶分析、核

糖体分型、基于 PCR 分型技术、脉冲场凝胶电泳(pulsed-fieldgel electrophoresis,PFGE)和扩增片段多态性分析等[127]。食源性疾病国家监测网络(PulseNet)(www.cdc.gov/pulsenet)采用的 1 天快速标准化的 PFGE 方法[133],非常方便地被用来调查弯曲菌引起的疫情[16]。但是,基因组的重新编码导致 PFGE 图谱的变化使得数据分析具有难度[134]。DNA 测序技术的发展提供了在核酸水平检查菌株之间变异的方法,建立了基于 DNA 测序的亚型分型系统,如多位点序列分型(multilocus sequence typing,MLST)等方法[135]。MLST 对于研究空肠弯曲菌的种群结构和分子流行病学是很有用的,尽管常见的循环序列型(circulating sequence types)会对由这些菌株引起的暴发流行的识别造成问题[136-137]。新一代测序平台的快速发展,使得通过全基因组序列测定分析对空肠弯曲菌进行分子分型成为了可能。但是,由于全基因组序列数据的分析需要专门的技术人员和信息技术基础设施和工具,这限制了这种方法在短时间内用于常规的空肠弯曲菌亚型分型[138]。目前,没有单独的分型方法可以满足操作者的所有需要,多种方法的结合,如血清学分型和分子分型(PFGE 或 MLST)的结合,应该被用来鉴定弯曲菌相关菌株之间的关系和研究弯曲菌感染的流行病学[127]。关于分子分型方法及其在弯曲菌流行病学研究应用方面的详细综述已另有报道[139-140]。

若干分型方法已被用于弓形菌的研究[52]。关于弓形菌的 MLST 分型研究已于多年前提出[141]。有学者对不同来源和分离自不同地域的 374 株弓形菌菌种之间的差异进行了研究,但没有发现 MLST 的分型与菌株来源或地域之间的相关性。

十、血清学试验

在感染免疫反应中,血清 IgG、IgM 和 IgA 水平增高,但血清和粪便中的 IgA 在感染的开始几周内出现,然后很快下降[142-143]。不同血清抗体检查方法在检测弯曲菌感染的敏感性和特异性上均存在较大差异,且试验的性能也显示出人群依赖性。弯曲菌的抗体检测已被用来研究 GBS 和活动性关节炎患者[144]。感染弯曲菌的患者也可能出现军团菌抗体假阳性[145]。血清学试验可用于流行病学调查研究[146],但不建议作为疾病的常规诊断方法[147]。

十一、抗菌药物敏感性试验

空肠弯曲菌和大肠弯曲菌对不同的抗菌药物的敏感性差异较大,包括大环内酯类、氟喹诺酮、氨基糖苷类、氯霉素和四环素。大环内酯类药物用于治疗空肠弯曲菌和大肠弯曲菌引起的胃肠道感染,对于敏感菌株,也可选用氟喹诺酮类药物[148]。使用大环内酯类药物或氟喹诺酮类药物早期治疗敏感弯曲菌引起的感染可以清除粪便中的病原体,并缩短病程[17]。

空肠弯曲菌和大肠弯曲菌一般对大环内酯类药物敏感。2014 年在美国,根据肠道细菌国家抗菌药物耐药监测系统(National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria,NARMS)报道,对于大环内酯类抗菌药物,空肠弯曲菌耐药率小于 2%,大肠埃希菌耐药率约为 10%。对于红霉素的耐药率,大肠弯曲菌总体高于空肠弯曲菌,并且差异很大,某些研究中,耐药率由 25%到 50%不等。

虽然环丙沙星在治疗弯曲菌感染时有效,但是在美国,菌株的耐药率相当高。2014 年,据 NARMS 报道,空肠弯曲菌耐药率为 26.7%,大肠弯曲菌耐药率为 35.6%[149]。感染耐氟喹诺酮空肠弯曲菌的患者,其腹泻病程延长,因此检测菌株可以预示是否应考虑进行抗菌药物治疗[150-151]。空肠弯曲菌和大肠弯曲菌对某些 β 内酰胺类抗生素,包括青霉素和窄谱头孢菌素耐药,但亚胺培南有很好的抗弯曲菌活性。

肠外治疗用于系统性胎儿弯曲菌感染,所用的药物包括氨苄西林、氨基糖苷类、亚胺培南和氯霉素,其用药根据感染的类型而定。海鸥弯曲菌对萘啶酸耐药,但对氟喹诺酮敏感,对大环内酯类耐药一般很少[150]。乌普萨拉弯曲菌一般对多种抗菌药物敏感,对大环内酯类和氟喹诺酮耐药率很低[150]。巴策尔弓形菌和嗜低温弓形菌对大环内酯类和氟喹诺酮也有不同程度的耐药[150]。

临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute,CLSI)[152]和欧洲抗菌药物敏感性试验委员会(Eurepean Committee on Antimicrobial Susceptability Testing,EUCAST)[153]

都出版了对弯曲菌属药敏检测的标准。纸片扩散法(K-B 法)可以用来检测大环内酯类、氟喹诺酮类及四环素类这几类药物，同时 CLSI[152] 和 EUCAST 也出版了解释标准[153-154]。可以采用梅里埃公司的浓度梯度法(E-test)检测弯曲菌的药敏结果，该方法与其他检测方法的相关性很好[155-157]。依 CLSI 和 EUCAST 的标准，肉汤稀释法是另一种检测药敏的方便方法[152-153]。

十二、结果的评价、解释和报告

无论是通过培养方法还是通过 FAD 批准的肠道病原体分析试剂盒检测后所提交到实验室的腹泻患者粪便标本，均应该进行包括最常见的空肠弯曲菌和大肠弯曲菌在内的弯曲菌分离培养。除了流行病学研究目的外，不进行成形粪便的培养。从急性腹泻患者分离到弯曲菌通常是有意义的，因为在发达国家中弯曲菌的携带率低，然而在发展中国家，其临床意义的解释较困难，尤其存在其他肠道致病菌时。急性感染中，粪便中通常有大量的病原体存在，但病原体的数量既不与感染的严重程度相关，也不表明即为携带者。为检测典型弯曲菌的粪便标本革兰染色分析是一种高度敏感和特异的检测方法，这种方法可对弯曲菌感染做出快速的初步诊断。其他菌种，如胎儿弯曲菌胎儿亚种和乌普萨拉弯曲菌，可为导致腹泻的主要病原体，但难以用常规选择性培养基分离。本章介绍的包括替代性培养技术在内的特殊方法是必需的，并在有特殊要求时进行检测。氧化酶阳性、弯曲的革兰阴性杆菌，并且马尿酸盐水解试验阳性，不需进一步检测，即可报告为空肠弯曲菌。鉴定其他菌种的重要性视临床情况而定，但分离自血液及其他无菌部位的标本需进行鉴定试验，因为其结果可能影响抗菌药物的治疗。鉴于空肠弯曲菌分离株中氟喹诺酮耐药的菌株比例极高，建议只对接受肠胃炎治疗的患者进行氟喹诺酮敏感性试验，而对分离自无菌部位的菌株，则均应进行抗菌药物敏感性试验。

参考文献请扫二维码查阅

第59章　螺杆菌属

MARC ROGER COUTURIER

（鲁炳怀　译；李敏、苏建荣　审校）

一、分类学

螺杆菌属（*Helicobacter*）归属于变形菌（*Epsilonproteobacteria*）纲目螺杆菌（*Helicobacteriaceae*）科，以前归属于变形菌纲目下ε亚纲（*Proteobacteria epsilon*）。幽门螺杆菌（*H. pylori*）为螺杆菌属模式菌株[1]。该科中的其他五个菌属包括：*Sulfuricurvum*，*Sulfurimonas*，*Sulfurovum*，*Thiovulum*，和沃廉菌属（*Wolinella*）[以产琥珀酸沃廉菌（*Wolinella succinogenes*）为模式菌株]。沃廉菌属及螺杆菌属与弯曲杆菌属（*Campylobacter*）表型非常相似。其余菌属将不再讨论，它们主要是从富含硫的环境，如通风口中分离出来的，尚无临床意义。

螺杆菌属（*Helicobacter*）所含菌种仍在不断增加。1989年正式提出该菌属类别[2]，当时仅包括2个菌种幽门螺杆菌（*H. pylori* 与鼬鼠螺杆菌 *H. mustelae*）。1991年进行修改，新纳入了2个菌种，包括同性恋螺杆菌（*H. cinaedi*）与芬纳尔杆菌（*H. fennelliae*）[3]，到目前为止该菌属已经增至39种菌（包括"*Candidatus*"状态的菌种）（表59-1）。螺杆菌属的基因组G+C碱基含量在30雪豹幽门螺杆菌（*H. acinonychis*）至48犬螺杆菌（*H. canis*）mol%之间，这与弯曲杆菌的G+C含量非常接近。

表59-1　螺杆菌菌种、宿主与疾病谱

螺杆菌菌种	主要宿主	主要感染部位	致人类疾病
胃螺杆菌			
弱螺杆菌（*H. acinonychis*）	大型猫科动物（猎豹）	胃	未见报道
棒状螺杆菌（*H. baculiformis*）	猫	胃	未见报道
比佐泽罗螺杆菌（*H. bizzozeronii*）	狗、猫	胃	胃炎、溃疡
（待定）牛螺杆菌（"*Candidatus* Helicobacter bovis"）	牛	胃	胃炎
鲸目螺杆菌（*H. cetorum*）	海豚、鲸	胃	未见报道
犬胃螺杆菌（*H. cynogastricus*）	狗	胃	未见报道
猫螺杆菌（*H. felis*）	猫、狗	胃	胃炎、溃疡
海尔曼螺杆菌（*H. heilmannii*）	人	胃	胃炎、溃疡
喜马拉雅螺杆菌（*H. himalayensis*）	土拨鼠	胃	未见报道
幽门螺杆菌（*H. pylori*）	人	胃	胃炎、溃疡、MALT淋巴瘤、胃癌
沙门螺杆菌（*H. salomonis*）	狗	胃	胃炎、溃疡
猪螺杆菌（*H. suis*）	猪、人	胃	胃炎、溃疡
肠肝螺杆菌			
鹅螺杆菌（*H. anseris*）	鹅	肠	未见报道
野猪螺杆菌（*H. apri*）	野猪	肠	未见报道
金黄色螺杆菌（*H. aurati*）	啮齿类动物（仓鼠）	肠	未见报道

（续 表）

螺杆菌菌种	主要宿主	主要感染部位	致人类疾病
胆汁螺杆菌(*H. bilis*)	啮齿类动物、狗	肠、肝	败血症
黑雕螺杆菌(*H. brantae*)	鹅	肠	未见报道
犬螺杆菌(*H. canis*)	狗	肠	菌血症、蜂窝织炎
胆囊螺杆菌(*H. cholecystus*)	啮齿类动物（仓鼠）	肝	未见报道
犬狗螺杆菌(*H. canicola*)	狗	肠	未见报道
同性恋螺杆菌(*H. cinaedi*)	啮齿类动物、狗、灵长类	肠	结肠炎、败血症、蜂窝织炎
马螺杆菌(*H. equorum*)	马	肠	未见报道
芬内尔螺杆菌(*H. fennelliae*)	狗	肠	结肠炎、败血症
肝螺杆菌(*H. hepaticus*)	啮齿类动物	肠、肝	未见报道
猕猴螺杆菌(*H. macacae*)	猴	肠	未见报道
土拨鼠螺杆菌(*H. marmotae*)	啮齿类动物(旱獭)、猫	肠、肝	未见报道
乳鼠螺杆菌(*H. mastomyrinus*)	啮齿类动物(Mastomys 鼠)	肠、肝	未见报道
鼠科螺杆菌(*H. muridarum*)	啮齿类动物	肠	未见报道
鼬鼠螺杆菌(*H. mustelae*)	白鼬、水貂	胃	未见报道
帕梅特螺杆菌(*H. pametensis*)	鸟类(燕鸥)、猪	肠	未见报道
啮齿螺杆菌(*H. trogontum*)	啮齿类动物	肠	未见报道
盲肠螺杆菌(*H. typhlonius*)	啮齿类动物	肠	未见报道
无鞘菌种(Unsheathed)			
加拿大螺杆菌(*H. canadensis*)	鸡、鹅	肠	胃肠炎
甘曼螺杆菌(*H. ganmani*)	啮齿类动物(鼠)	肠	肝疾病?
仓鼠螺杆菌(*H. mesocricetorum*)	啮齿类动物(仓鼠)	肠	未见报道
鸡螺杆菌(*H. pullorum*)	鸡	肠	胃肠炎
啮齿类螺杆菌(*H. rodentium*)	啮齿类动物	肠	未见报道
H. valdiviensis	野生鸟类	肠	未见报道
温厄姆螺杆菌("*H. winghamensis*")	啮齿类动物	肠	胃肠炎

100年前在动物与人中均观察到胃部螺旋形菌(spiral bacteria)，但是罕有培养。1982年发现了 *Campylobacter pyloridis*(后来命名为幽门螺杆菌)，是从胃炎患者的胃活检样本中培养出来的，这一发现激发了研究者的热情[4]。根据16S rRNA基因序列做的种系进化分析(Phylogenetic)，显示该属内菌种形成了不同的群。其大致可分为2类：胃来源(胃部)与肠肝来源(小肠、肝或者胆道)，此外还包括肠肝菌的亚群，这些亚群缺乏特征性鞘内鞭毛，但是有N端连接糖基化系统，与弯曲杆菌属非常相似[5]。在研究相关性密切的螺杆菌属(*Helicobacter*)时，由于螺杆菌具有高度的自然转化性与遗传可塑性，依据16S rRNA基因序列进行的种系进化(Phylogenetic)分析的敏感性有不足之处。仅采用16S rRNA基因可导致物种间的错误鉴定(如：*H. canicola* 误鉴定 *H. cinaedi*)[6]。目前的研究集中在基于多个基因序列的物种鉴定上，包括23S rRNA、热休克蛋白60、回旋酶A，以及尿素酶A-尿素酶B[7-9]。回旋酶A蛋白测序也用于螺杆菌菌种的鉴定[9]。Ménard和他的同事们提出了一个详细的多基因系统发育分析模型，用于目前已被提出和接受的螺杆菌物种的多基因系统发育分析，也可作为其他物种的系统发育分析的参考。

除幽门螺杆菌外，胃部一些其他的螺杆菌也难以培养，16S rRNA基因序列分析又高度相似，导致这些菌难以分类，问题重重。较大胃螺旋形菌(large gastric spiral bacteria)最初指的是"人胃螺旋菌"("*Gastrospirillum hominis*")，随后命名为"海尔曼螺杆菌"(*H. heilmannii*)[10-11]，自此之后则以"海尔曼螺杆菌"(*H. heilmannii*)之名得到全面表述[12]。猪螺杆菌(*H. suis*)是最近才被分

离培养出来，并加以命名而正式为人们认知[7]。进一步的研究对该菌有了更明确的认识，包括确认样本来源，以及与之密切相关的在狗与猫中培养出的其他菌种比佐泽罗螺杆菌（*H. bizzozeronii*），沙门螺杆菌（*H. salomonis*）与猫螺杆菌（*H. felis*）][10]。进一步的系统发育分析研究表明，*Helicobacter suis*（最近培养出来并被正式承认和命名[7]）包括其他可培养螺杆菌，之前被错误地鉴定为其他非人类致病菌（例如，*H. bizzozeronii*，*H. salomonis* 和 *H. felis*）[13]。本章中，胃部来源的海尔曼螺杆菌（*H. heilmannii*）与其他近缘菌种统称为海尔曼螺杆菌（*H. heilmannii*）样菌（"*H. heilmannii*"-like organisms)（HHLO），因为在早期临床研究中无法明确鉴定上述菌种[14]。此外，梭状菌（spindle-shaped cells）最早被称为"*Flexispira rappini*"，其特征为周围胞质原纤维及双极鞘内鞭毛丛环绕（periplasmic fibrils 与 bipolar tufts of sheathed flagella）[10]，其分类的问题也没有完全解决。种系进化分析表明该菌有 10 个不同类别，其中有一些与螺杆菌属于同一群[11]。*Flexispira* 类别 2、3 与 8，目前认为构成一个单独的菌种——胆汁螺杆菌（*H. bilis*）[15]，而类别 1、4 与 5 则被命名为啮齿螺杆菌（*H. trogontum*）[16]。除了幽门螺杆菌属，许多其他螺杆菌的全基因组序列均可检索到，这有可能推进螺杆菌属分类学的深入研究。随着可利用的螺杆菌基因组越来越广泛，未来可使用比较基因组学开展更高水平的分类学研究。

二、螺杆菌介绍

典型螺杆菌属的细菌呈弯曲或螺旋形弯曲，两端尖，呈梭形，部分含有胞浆原纤维。菌体宽 0.3～0.6 μm，长 1～10 μm。培养时间延长或生长环境不佳，螺杆菌可呈椭圆体或球形体，这样形态的细菌无法传代培养。螺杆菌均为革兰阴性菌，可产生细胞色素氧化酶，无芽胞生成。含有单根或多根鞭毛，可运动。菌种间鞭毛形态呈多样化。鞭毛多位于鞘内；例如，幽门螺杆菌有多根（每个细菌 4～8 根）单极鞘内鞭毛，末端膨起（表 59-2）。与此相反，有七种螺旋杆菌菌种为非鞘内鞭毛（表 59-2）。动物胃部发现的螺杆菌属，除了 *H. baculiformis*（杆状菌）外，均呈明显的密螺旋外形，每个菌体最多可达到 20 根多极鞭毛（multiple flagella），并呈聚集生长。最适生长温度为 37℃。螺杆菌为有机营养菌（organotrophs），呈呼吸型代谢，微需氧。最适生长环境与菌种有关，彼此间存在差异。有一些菌种，如 *H. ganmani*，为啮齿动物肠道内菌，生长的最佳环境是厌氧箱，但是严格的厌氧条件对该菌来说又是致命的。典型螺杆菌培养需要保持一定的环境湿度，温度维持在 37℃，微需氧（氧浓度 5%～10%），CO_2 浓度略高（5%～12%）。在微需氧环境中添加 H_2（3%～5%）往往有利于细菌生长。螺杆菌在常规厌氧环境下虽可培养，但生长情况并不好。不同螺杆菌的主要生化反应表型彼此不同，如脲酶水解试验（urease hydrolysis）、亚硝酸盐还原试验（nitrate reduction）、吲哚乙酸酯水解试验（indoxyl acetate hydrolysis）及碱性磷酸酶活性试验（alkaline phosphatase activity）等，因此可利用这一点进行菌种鉴定（表 59-2）。然而，目前没有任何一个常规特征能可靠区分螺杆菌与弯曲杆菌（*Campylobacter*）。所有螺杆菌都不能利用碳水化合物，因此不能通过传统微生物实验室开展的生化试验加以鉴别。幽门螺杆菌全基因组分析显示，该菌不能利用复杂的碳水化合物作为能源，若将其与空肠弯曲杆菌（*Campylobacter jejuni*）的全基因组比较，两者在能量代谢与趋化系统方面存在显著差异[15]。

三、流行病学与传染方式

从多种哺乳动物宿主的胃肠道与肝胆系统都可能分离出螺杆菌，包括人、狗、猫、牛、羊、猪、啮齿类动物、其他灵长类动物、猎豹、雪貂、兔、海豚、鲸鱼、马，以及鸡和野生鸟类等（表 59-1）。

（一）幽门螺杆菌

幽门螺杆菌是寄生于人胃部的主要致病菌，脲酶试验强阳性。该菌定植于胃贲门、胃体和胃窦，也可出现于胃化生的十二指肠近端。

与其他病原体不同，人类幽门螺杆菌感染的发病率和流行率相当高。早期曾经采用血清学研究幽门螺杆菌感染的患病率情况。这些研究表明该菌感染分布非常广泛，估计全球人口有半数左右定植该菌，其中只有约 10% 的宿主具有临床症状[18]。在发达国家，幽门螺杆菌感染率似乎有所下

表 59-2　螺杆菌属菌种生物学特性[a]

菌名	触酶	尿素酶	硝酸盐还原	吲哚乙酸酯	碱性磷酸酶	γ-谷氨酰转肽酶	生长条件		耐药性		Mol% G+C	鞭毛	鞘内鞭毛 (Flagellum sheath)
							42℃	1%甘氨酸	萘啶酸	头孢氨苄			
胃螺杆菌													
H. acinonychis	+	+	−	−	+	+	−	−	R	S	30	B(2～5)	+
H. baculiformis	+	+	+	−	+	+	−	−	I	R	ND	B(11)	+
H. bizzozeronii	+	+	+	+	+	+	+	−	R	S	ND	B(10～20)	+
"*Candidatus* H. bovis"	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	M/B(1～4)	?
H. canicola	+	−	−	−	+	−	+	−	S	R	38～40	M(2)	+
H. cetorum	+	+	−	−	−	+	+	−	I	S	ND	B(2)	+
H. cynogastricus	+	+	+	−	+	+	−	−	ND	ND	ND	B(6～12)	+
H. felis	+	+	+	−	+	+	+	−	R	S	42	B(14～20)	+
H. heilmannii	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	B(10～20)	+
H. himalayensis	+	−	+	−	+	+	+	−	S	R	ND	M(1～2)	+
H. pylori	+	+	−	−	+	+	−	−	R	S	35～37	B(4～8)	+
H. salomonis	+	+	+	+	+	+	−	−	R	S	ND	B(10～23)	+
H. suis	+	+	−	−	+	+	−	−	ND	ND	ND	B(4～10)	+
肠杆螺杆菌													
H. anseris	−	+	−	+	−	−	+	W	S	R	ND	B(2)	+
H. apri	+	−	+	−	+	−	+	−	S	R	40	M(2)	+
H. aurati	+	+	−	+	+	+	+	−	S	R	ND	B(7～10)	+
H. bilis	+	+	+	−	−	+	−	+	R	R	ND	B(3～14)	+
H. brantae	−	−	−	+	−	−	+	W	S	R	ND	B(2)	+
H. canis	−	−	−	+	+	+	+	−	S	I	48	B(2)	+
H. cholecystus	+	−	+	−	+	−	+	+	I	R	ND	M(1)	+
H. cinaedi	+	−	+	−	−	−	−	+	S	I	37-38	B(1～2)	+
H. equorum	+	−	+	−	+	−	−	−	R	R	ND	M(1)	+
H. fennelliae	+	−	−	+	+	−	−	+	S	S	35	M/B(1～2)	+
H. hepaticus	+	+	+	+	−	−	−	+	R	R	35	B(2)	+

（续 表）

菌名	触酶	尿素酶	硝酸盐还原	吲哚乙酸酯	碱性磷酸酶	γ-谷氨酰转肽酶	生长条件		耐药性		Mol% G+C	鞭毛	鞘内鞭毛 (Flagellum sheath)
							42℃	1%甘氨酸	萘啶酸	头孢氨苄			
H. marmotae	+	+	−	−	+	−	+	+	R	R	ND	B(2)	+
H. mastomyrinus	+	+	−	−	−	−	+	+	R	R	ND	B(2)	+
H. muridarum	+	+	−	−	+	+	−	−	R	R	34	B(10～14)	+
H. mustelae	+	+	+	+	+	+	+	−	S	R	36	P(4～8)	+
H. pametensis	+	−	+	−	+	−	+	+	S	S	38	B(2)	+
H. trogontum	+	+	+	−	−	+	+	ND	R	R	ND	B(4～7)	+
H. typhlonius	+	−	+	−	−	−	+	+	S	R	ND	B(2)	+
无鞘菌种													
H. canadensis	+	−	W	+	−	−	+	+	R	R	33	B(2)	−
H. ganmani	−	−	+	−	−	ND	+	−	R	S	ND	B(2)	−
H. mesocricetorum	+	−	+	ND	+	−	+	−	S	R	ND	B(2)	−
H. pullorum	+	−	+	−	−	ND	+	−	R	S	34-35	M(1)	−
H. rodentium	+	−	+	−	−	−	+	+	R	R	ND	B(2)	−
H. valdiviensis	+	+/−	−	+	−	−	+	+	V	R	ND	M(1)	−
"*H. winghamensis*"	−	−	−	+	+	ND	−	+	R	R	ND	B(2)	−

注：[a]+. 阳性；−. 阴性；W. 弱阳性；ND. 不确定；S. 敏感；I. 中介；R. 耐药；B. 双极；M. 单级；P. 周生(鞭毛)；?. 未知

降。在美国，这种下降趋势在非西班牙裔白人中最为明显。而即使在相同的社会经济和地理区域内，西班牙裔和非裔美国人的患病率仍然很高[19-20]。在欧洲，东欧国家比西欧国家的人群感染率要高。另有证据显示，在发达地区幽门螺杆菌的感染率随着卫生条件与生活水平的改善而不断下降[21-22]。在发展中国家，幽门螺杆菌在人群低龄时就可导致感染；多数是到了10岁的儿童患者，而成年人群的总感染率居高不下(高达90%)。与此相比，在发达国家，可以观察到感染率随年龄增长而增加，1980年之后出生人群(<30岁)感染率比较低，但是在老年人群中感染率却高达40%～50%。这种现象并不是因为年龄增加所致感染渐次累积而递增，而是因年代不同所导致感染率差异，即世代效应所致[22-23]。经培养确认的幽门螺杆菌感染，在不同国家之间差异非常大，这与当地治疗指南的制订及具体培养情况有关。

人与人之间幽门螺杆菌传播方式与途径尚未明确，流行病学证据表明存在口-口与粪-口传播途径。其中粪-口途径多见于发展中国家，这些地区不佳的卫生条件及水源污染使幽门螺杆菌有较大的传播风险[22]。目前还没有令人信服的证据表明公共水源污染在幽门螺杆菌转染中扮演何种角色，因为水源样本培养少有阳性[24]。目前亦无证据表明幽门螺杆菌的活菌能够在经过消毒的常规供应水中存活，即使该菌有可能在此状况下生存，但是仍无法培养[25]。曾经有报道称水供应分流系统可能是幽门螺杆菌被动聚积的位置[26]。口-口传播途径有赖于反流的胃液中存在的幽门螺杆菌，这样该菌才能够暂时性地在口腔定植。另一种口-口传播的途径是通过呕吐物，呕吐物中的幽门螺杆菌可存活数小时[27]。人际间传播最多见的是儿童时代家庭成员之间的传播，特别是母子、兄弟姊妹之间，以及其他家庭内部的接触传播[28]。家庭成员为研究人际间的传播提供了最佳机会，但是对于此种证据的解释却非常复杂。在南非农村，根据DNA序列类型推断幽门螺杆菌的常见的水平传播模式可见于家庭成员之间，也可见于无关系个体之间，这反映了大部分发展中国家高发病率的情况[29]。与此不同的是，在城区家庭间幽门螺杆菌的克隆株传播在直系亲属间更为多见[29]。

(二)海尔曼螺杆菌样菌

一般认为人类海尔曼螺杆菌样菌("H. heilmannii"-like organism，HHLO)感染非常少见。组织学检查发现，发达国家的感染率<0.3%，其他地区约6%[29]。采用直接活检组织进行PCR检测的方法，检测到HHLO在英国感染率较高，达到2%，该方法还可检测多种HHLO亚种[30]。目前，HHLO分类情况相对明确，采用菌种特异试验方法对过去认为是海尔曼螺杆菌感染的病例进行回顾性评估，结果证实一种或多种动物源性HHLO都可以导致感染，这些致病菌主要包括沙门螺杆菌(*H. salomonis*)、猫螺杆菌(*H. felis*)、猪螺杆菌(*H. suis*)及"(待定)牛螺杆菌"("*Candidatus H. bovis*")[13]。此项研究表明猫、狗与猪都可能是传染源，但是传染途径尚不清楚。

(三)肠肝螺杆菌

肠肝螺杆菌栖居于多种哺乳动物与鸟类宿主的肠道与肝胆管，其中有一些菌种可感染人类并引起临床症状，如胆汁螺杆菌、加拿大螺杆菌、犬螺杆菌、同性恋螺杆菌、芬纳尔螺杆菌、鸡螺杆菌(*H. pullorum*)及"温厄姆螺杆菌"(表59-1)。目前对于这些菌种的患病率与传播途径所知甚少，但是研究提示此类菌可从动物传染给人。*H. pullorum*是明确的动物传染病致病菌，曾经在肉鸡与蛋鸡[31]及零售生鸡肉上检出[32]。

四、临床意义

(一)幽门螺杆菌

Marshall与Warren[33]首次提出了幽门螺杆菌与消化性溃疡之间的联系，自此之后幽门螺杆菌就成了临床上螺杆菌属中最重要的菌种。目前已经明确幽门螺杆菌是消化性溃疡主要病因，也是胃癌的重要风险因素[34]。幽门螺杆菌感染是萎缩性胃炎、胃溃疡、胃腺癌、胃黏膜相关淋巴样组织(gastric mucosa-associated lymphoid tissue，MALT)淋巴瘤等疾病的独立危险因素[23]。幽门螺杆菌感染的患者可能在感染两周内发展为急性胃炎(腹痛、恶心与呕吐)。在大多数感染人群中，该菌可发展为慢性感染，典型的是慢性胃炎。黏膜主要感染经常为胃窦部黏膜感染(胃窦为主的

胃炎),可诱发患者的胃酸增多症与十二指肠溃疡。许多感染幽门螺杆菌的患者常有反复的腹部症状(非溃疡性消化不良),但是没有溃疡。在这些患者中,采用治疗手段根治幽门螺杆菌也可使患者临床症状改善[35]。十二指肠炎患者常常伴有幽门螺杆菌感染,多达16%的幽门螺杆菌感染的患者可并发十二指肠溃疡[36]。胃MALT淋巴瘤是一种罕见的胃部肿瘤,病因就是幽门螺杆菌感染,也是唯一一种可采用抗菌药物治愈的肿瘤[37]。对于无法解释的缺铁性贫血与慢性原发性血小板减少性紫癜的患者,也可以推荐进行幽门螺杆菌根除治疗[38]。许多其他的慢性疾病中,典型的如缺血性心脏病、炎症性肠病、肝胆管疾病,幽门螺杆菌感染的临床意义还仅是推测性的,尚无确凿证据[39]。

(二)HHLO

目前尚未确认HHLO感染是否能作为成人轻中度胃炎、消化性溃疡及胃MALT淋巴瘤的致病因素,但是他们彼此有密切的联系[13,40]。HHLO感染的病原学目前还不清楚,因为临床此种感染比较少见,而且在常规临床实验室此病原菌也无法培养[13]。

(三)肠肝螺杆菌

过去25年间有相关报道,成人与儿童中肠肝螺杆菌可引起感染,并分离得到了菌株,但是该菌的临床意义依然并未明确。肠肝螺杆菌主要从血液中分离得到,有时也可从粪便样本分离到[41-42]。与菌血症相关的螺杆菌虽然比较罕见,但是临床意义最大,且更多见于罹患基础疾病的患者。有推测此类螺杆菌定植于人类下消化道,因为患者化疗或放疗可能造成消化道黏膜损伤,使得该菌侵入血流,导致感染。

同性恋螺杆菌感染可呈多种临床表现(直肠结肠炎、肠胃炎、新生儿脑膜炎、局部疼痛与皮疹、菌血症),特别是在基础免疫低下的患者中[43]。同性恋螺杆菌也与冠心病有相关性[41]。曾有报道显示芬纳尔螺杆菌(*H. fennelliae*)是人类直肠结肠炎、胃肠炎与菌血症致病菌,特别见于免疫抑制的患者[42-43]。鸡螺杆菌(*H. pullorum*)与严重胃肠炎有关[44]。犬螺杆菌(*H. canis*)与炎症性肠病有关,并已从健康和免疫功能低下患者的血液中分离出来[45-46]。

螺杆菌的其他菌种偶尔也可从感染患者中分离到,但临床意义尚不清楚,包括加拿大螺杆菌(*H. canadensis*)[47]、"温厄姆螺杆菌"("*H. winghamensis*")[48]及肝螺杆菌(*H. hepaticus*)[41](表59-1)。

五、样本的采集、转运与保存

(一)胃活检样本

用于直接诊断幽门螺杆菌的胃活检样本,常规应采用食道、胃、十二指肠镜获取胃窦与胃体的样本。幽门螺杆菌对于干燥、空气环境与室温都很敏感。胃活检样本如短期内(最长不超过约2 h)转运,置于无菌生理盐水即可。但是如果想保持该菌存活以用于培养,最好使用转运培养基。可供使用的转运培养基包括:半固体转运培养基[如Portagerm幽门螺杆菌转运培养基(bioMerieux Inc.,Durham,NC)]或者室内转运培养基(内含3.5%脑心浸液、2.5%酵母抽提物、5%无菌马血清、幽门螺杆菌选择性添加剂[Dent's,10 μg/ml万古霉素,5 μg/ml甲氧苄啶,5 μg/ml头孢磺啶,以及5 μg/ml两性霉素B(Oxoid Ltd.,Basingstoke,United Kingdom)]。其他可以替代的培养基包括Stuart转运培养基或含有20%甘油的布鲁肉汤。如果活检样本的幽门螺杆菌培养在24 h内不能操作,推荐将样本置转运培养基中并贮藏于4 ℃条件下过夜,次日室温条件转运。活检样本如需长期保存,应置于10%甘油培养基中,并冷冻于−70℃。

(二)粪便样本

幽门螺杆菌及其他胃螺杆菌一般不能自人粪便样本中分离,因此并不推荐常规培养粪便样本。粪便样本可用于幽门螺杆菌粪便抗原试验(stool antigen tests,SATs),样本采集后应立即进行检测或根据说明书进行保存。避免样本反复冻溶。肠肝螺杆菌(enterohepatic helicobacters)可导致肠道疾病,此时粪便样本需要培养。然而在这种情况下,可能更需要检测弯曲杆菌,弯曲杆菌样本的采集、转运与贮藏相关程序也可同样适用于肠肝螺杆菌种(弯曲杆菌部分,见第58章)。

(三)血液样本

用于幽门螺杆菌感染诊断的血清学试验需要

采集血液样本。血液样本的采集、转运与贮藏应参照标准程序。肠肝螺杆菌也可能穿过肠壁引起侵入性感染，此时应采集疑似患者的外周静脉血用于微生物学试验。血培养样本采集应使用商品化需氧与厌氧血培养瓶，样本的转运与贮藏应参照标准程序。

(四)其他临床样本

逐渐发展起来的一些实验室检测需要收集其他类型样本，这些检测项目有助于幽门螺杆菌感染的诊断，在某些情况下可能适用。

患者胃液可经鼻胃管导入后穿刺获得，也可通过"吞线试验"方法采样(string test，患者吞咽一根线，胃液反流后再回收)。胃液样本可以用于培养与PCR检测，查找幽门螺杆菌。胃液不能代替胃组织活检作为常规样本，因为在使用胃液样本进行幽门螺杆菌培养时，将会因为鼻咽部正常菌群过度生长而致培养失败。此时可以采取一些抑制措施，如对样本进行酸化处理[49]。如果用胃液作为样本，应在4℃条件下转运，立即处理，不得延误。

六、直接检测

(一)胃活检样本的显微镜检测

需要进行病理学检测的胃活检样本组织应使用固定剂保存(10%甲醛)，并进行石蜡包埋，这种方法广泛用于幽门螺杆菌感染诊断。标准苏木素与伊红组织染色不足以检测幽门螺杆菌，但是经过良好组织学诊断培训的人员，采用Warthin-Starry染色可非常好地观察到细菌。这种检测方法特异性通常较好，但是非典型细菌可导致鉴定错误。最佳条件下，组织学诊断的敏感性与特异性均可达95%[22]。使用幽门螺杆菌特异性抗体进行免疫组织学染色，可以提高诊断特异性。然而，有文献报道使用用单克隆和多克隆抗体染色可与 *H. heilmannii* 发生交叉反应[50]。与 *H. heilmannii* 的交叉反应可提供有临床价值的信息；然而，病理学家必须明确报告所见到的病原体是 *H. pylori* 还是 *H. heilmannii*。本章内容不涉及组织方法学及对组织学检测结果的解释，但从微生物学实验室的角度来看，活检样本直接涂片或者印片细胞学涂片为观察幽门螺杆菌提供了快速细菌学检测结果。染色的方法可包括革兰染色、快速吉姆萨染色、或者荧光吖啶橙染色。较少见的胃HHLO感染也可以采用吉姆萨染色，然后在显微镜下观察。HHLO与幽门螺杆菌相鉴定的要点在于前者明显紧密螺旋外形[51]。

(二)体液样本的显微镜检测

直接观察阳性血培养中螺杆菌可能需要特殊染色，特别是经验尚浅的人员查找此类菌时，尤需如此。革兰染色很难发现菌体纤细、形如海鸥样的 *H. cinaedi* 菌，此时需要吖啶橙染色，暗视野显微镜观察或者吉姆萨染色。一种改良的革兰染色法，以石炭酸(0.5%)或者碱基品红(0.1%)作为复染剂，增加了弱染色生物的染色强度，可有助于螺杆菌检测[50]。

(三)胃活检样本幽门螺杆菌检测脲酶试验

幽门螺杆菌可产生大量的菌外脲酶，可通过将活检组织样本加至含尿素介质中快速检测，这种检测方法称为快速脲酶试验(rapid urease test，RUT)[22]。脲酶可以催化尿素水解生成氨气与碳酸盐。氨气生成的净效应即可提高局部pH。脲酶活性构成了一些简单、便宜且易于操作的试验的基础，可由临床医生直接通过内镜操作。活检样本可置于包含pH指示剂的琼脂凝胶或试剂纸条上，如果样本中含足够量的幽门螺杆菌，尿素降解，产生氨气，会有颜色变化。商品化RUT包括琼脂凝胶法试验[如CLOtest(Kimberly-Clark，Neenah，WI)]，试剂条法[如PyloriTek(BARD，Murray Hill，NJ)及幽门螺杆菌快检试验(Biohit，Helsinki，Finland)]，上述试验均经过严格评估，特异性非常好[22]。这种方法检出幽门螺杆菌的敏感性也非常不错，但是敏感性高低有赖于黏膜活检样本中幽门螺杆菌密度及活检样本的采样数量。RUT在样本孵育24 h后检测敏感性最佳，而试剂条法则在取样1 h内检测结果最好，这也使得试剂条法成为真正意义上的快检试验。

(四)尿素呼气试验

尿素呼气试验(urea breath test，UBT)与RUTs相似，是通过间接检测脲酶活性诊断幽门螺杆菌的试验。与RUT不同的是，UBT属无创性操作，因此，可用于不符合进行食管胃十二指肠镜(esophagogastroduodenoscopy，EGD)活检临床

标准的患者。简而言之，使用非放射性活性的天然同位素(^{13}C)标记尿素，并让患者吸入。幽门螺杆菌产生的脲酶分解尿素，生成氨和$^{13}CO_2$。$^{13}CO_2$经血液吸收，输送到肺泡，呼气过程中被排出。已有综述对该试验进行了总结，包括影响检测结果的试验方法学及各种因素，试验的标准化，不同临床环境下如何应用等问题[22]。应用 UBT 具有很高的诊断准确性(＞95%)[52]。同时，在条件允许时，推荐诊断为幽门螺杆菌感染的成年患者应在治疗前与治疗后进行连续检测。最近一项前瞻性多中心研究结果表明^{13}C UBT 试验在诊断儿童幽门螺杆菌感染时操作简单，结果准确[53]。然而，UBT 的样本采集对于低龄儿童和智力低下的患者来说是复杂的，这些人群可以考虑采用幽门螺杆菌粪便抗原试验(stool antigen test，SAT)。

(五)幽门螺杆菌粪便抗原检测

SAT 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)，为现行的另一种有价值的诊断幽门螺杆菌感染诊断方法。该试验容易操作，而且具有无创性的优点。自从商品化试剂上市以来，各种检测试验盒已经在成年人与儿童的样本上进行了全面评估，评估结果显示该方法是优良的诊断方法。这些诊断试剂盒将多克隆抗体固定于微孔上[如 Premier Platinum HpSA(Meridian Bioscience，Inc.，Cincinnati，OH)]。一篇对 2004 年之前发表相关数据的系统综述，肯定了此类试剂盒在治疗前初步诊断及治疗后随访中的临床价值[54]。进一步研发改进，采用特异性单克隆抗体法的商品化试验盒[如 IDEIA HpStAR(Oxoid Ltd.，United Kingdom) and Premier Platinum HpSA PLUS(Meridian Bioscience，Inc.，Cincinnati，OH)]，经综述与 meta 分析显示，与多克隆试验盒相比，单克隆试验盒可以提高检测敏感性。例如在英国，治疗前成年人粪便单克隆抗体检测幽门螺杆菌的敏感性与特异性分别为 94%与 100%，均较高[55]，另外，研究称在芬兰幼儿人群中这些试验的表现也很优异[56]。与 UBT 一样，推荐使用 SAT 检测以确认幽门螺杆菌得到根除。在应用粪便抗原试验检测幽门螺杆菌是否得以根除治疗时，已经有研究注意到检测结果存在一定的假阳性，这可能是因为幽门螺杆菌经过治疗后降解形成球形体，而粪便样本中仍存在抗原所致[57]。有报道显示，在儿童人群中，一些粪便样本在 ELISA 检测时可呈一过性阳性，可能是因为患者有幽门螺杆菌或其他螺杆菌种的一过性感染所致[58]。单克隆抗体也可以用于免疫酶法快速床旁试验(rapid point-of-care tests)，诊断幽门螺杆菌感染[如 the ImmunoCard STAT! HpSA(Meridian Bioscience，Inc.，Cincinnati，OH)及 RAPID Hp StAR(Oxoid Ltd.，Basingstoke，United Kingdom)]。这些试验在临床及床旁检测等情况下的诊断效能已经过严格的评估。一般而言，这些试验的检测准确性或可信度不如 ELISA 试验[52,55]。

(六)核酸检测

1. 胃活检组织幽门螺杆菌检测 以 PCR 扩增及使用菌种特异性探针进行荧光原位杂交试验为基础的核酸试验，为胃活检样本中检出幽门螺杆菌提供了实用方法，该试验的检测时间显著快于培养法。核酸扩增最常用的扩增靶序列为 16S rRNA、*ureA*、*glmM*(以前称为 *ureC*)、*vacA* 及 *cagA* 基因[59]。此外，23S rRNA 基因也可用于检测幽门螺杆菌及药敏试验靶序列[23,60]。目前没有可用于临床试验室 PCR 检测胃活检样本的金标准方法，因此不推荐把 PCR 试验作为诊断患者感染唯一证据[59]。然而，PCR 试验在检测培养阴性的胃活检样本时价值非常大，特别是对于那些其他临床试验均显示有幽门螺杆菌感染但是培养阴性的患者。对于检测幽门螺杆菌的 PCR 引物进行系统研究发现 4 种效能最佳的试验均可达到胃组织＜100 CFU/ml 的检出限[59]。然而，上述 4 种试验没有任何一种可以达到 100%的特异性或敏感性，均可能产生假阳性结果。有 2 项最佳综合试验——分别为针对 *ureA* 基因的 HP64-f/HP64-r 引物及针对 16S rRNA 基因的 HP1/HP2 引物，在检测胃活检样本时敏感性与特异性均可达到＞90%。

2. 粪便样本中检测幽门螺杆菌 从粪便中直接检测 *H. pylori* 核酸是近年来临床检测的一个热点领域，可以作为基于 EGD 侵袭性检测的可行替代方法。这种检测方法的第一个主要挑战是粪便是一种含有多种 PCR 抑制剂[61]的复杂基质，通常需要复杂的 DNA 纯化方法来消除或降低这些抑制剂的干扰。该检测方法的另一个难点在于完整生物体在粪便中的高丰度是不可预测的，游离

核酸在通过肠道的过程中可能会被降解。这些因素要求直接从粪便中进行 *H. pylori* 核酸检测的方法需要具有优良的敏感性。

ClariRes 检测法(Ingenetix, Vienna, Austria)采用双探针 23S rRNA 基因定量 PCR[62] 检测大环内酯类抗药性,其改良版已用于有症状儿童[63]的病原菌检测(详细内容请参见下面的"抗菌药物敏感试验"部分)。对美国 BIOLINE 公司(Meridian Bioscience Inc., Cincinnati, OH)试剂检测粪便标本中幽门螺杆菌及大环内酯类耐药性突变进行评估,显示其敏感性为 93.8%,与 SAT 和 UBT 相似[64]。这些试剂将在临床试验中继续进行测试,测试结果最终提交给 FDA。本试验检测大环内酯类药物耐药性的能力是未来无创性检测的热点,该试验也可指导大环内酯类药物的临床治疗。

3. 胃活检样本中检测 HHLO 特异性试验已经开发用于检测胃活检样本中 HHLO 的菌种,这其中就包括采用直接 PCR 法[65],应用多重 PCR 技术可同时检测幽门螺杆菌与 HHLO[30]。荧光原位杂交试验(fluorescence in situ hybridization tests, FISH)采用菌种特异性探针,也可以用于检测人胃活检样本中的 HHLO[66]。

4. 临床样本中检测其他的螺杆菌 一项针对 16S rRNA 基因的 PCR 试验可以用于检测人便样本提取物中的 *H. pullorum*,然而该试验尚未得到认可[67]。除此之外,目前没有其他试验适用于检测粪便样本中有临床意义的肠肝螺杆菌。属水平 PCR 试验主要针对 16S rRNA 的靶基因序列,目前已经研发并用于检测各种各样的临床样本中其他种的螺杆菌,这些样本包括牙斑与唾液[68],肠道组织活检物样本[69],肝活检样本及样本组织(胆管与胆囊)[70]。这些试验一般主要用于特殊的流行病学及疾病相关研究,不大可能应用于常规试验室。此类 PCR 试验的检测仅在无其他感染证据时采用,因此需要谨慎解读结果[59]。

七、分离培养

(一)幽门螺杆菌的分离培养

用胃活检组织分离培养幽门螺杆菌并不困难。活检组织应立即接种到培养基,避免耽搁,或者首先搅匀样本,有利于提高培养阳性率。琼脂平板,如脑心浸液平板、布鲁菌培养基(brucella agar)、Wilkins Chalgren 培养基,以及胰蛋白大豆琼脂培养基可用于初代培养。根据之前的经验,哥伦比亚培养基加 10%的去纤维马血后也有很好的培养效果。包含 Dent 抗生素添加剂的选择性培养基[如幽门螺杆菌选择培养基(Oxoid Ltd., Basingstoke, United Kingdom)](参见本章"五、样本的采集、转运与保存")亦有良好的分离培养的效果。平板应在 35～37℃、湿润微需氧的环境下培养(4%O_2、5%CO_2、5%H_2 及 86%N_2),此环境可用气瓶与产气装置获得,也可使用培养仪[如,the MACS VA500 microaerophilic workstation (Microbiology International, Frederick, MD)]。不同实验室间使用的气体混合物具体比例不一,而培养环境使用 5%H_2 可促进螺杆菌的生长。观察培养平皿上是否有光滑、圆形小菌落出现,多于培养 48 h 后查见。如果使用气罐或气袋,则最初 48 h 内不应打开观察。为提高培养敏感性,应该尽量减少培养基暴露于空气中的时间。平皿培养最少 10 天,才可以报告阴性结果。生长菌落可转种至非选择培养基上培养,用于下一步试验。分纯的菌落可贮存在−80℃的冷冻管中[如:the Microbank bacterial preservation system(PRO-LAB Diagnostics, Austin, TX)细菌保存管]。

(二)其他螺杆菌种的分离培养

目前没有推荐的常规实验室方案用于人胃活检组织 HHLO 的分离培养。第一次也是唯一自人分离"*H. heilmannii*"的报道,是在非选择培养基(7%溶解马血),5%O_2 及 10%CO_2 环境下,培养 7 天后获得的,随后培养菌落被鉴定为比佐泽罗螺杆菌[71]。有一种新型的分离培养方法用于从猪胃组织中分离猪螺杆菌,所用培养基酸度很高,气体环境也有所改良[7],最近已经应用于人组织样本的培养。

肠肝螺杆菌群,如胆汁螺杆菌、加拿大螺杆菌、犬螺杆菌、同性恋螺杆菌、芬纳尔螺杆菌、鸡螺杆菌、"温厄姆螺杆菌",均可以在研究弯曲杆菌的过程中从罹患胃肠炎的患者粪便样本中分离出来。这些螺杆菌可在 37℃生长,但是 42℃时生长情况不一,42℃最常用于分离培养空肠弯曲菌(*C. jejuni*)。新鲜的粪便样本应采用选择性培养基或非选择性膜过滤方法,在 37℃、微需氧的环境下培养至少 7 天[72]。某些菌种的菌株可能需要 5%～

10% H_2 才适宜生长，如果这些菌对选择性分离培养基中的抗生素敏感，其培养将受到抑制。

有一些肠肝螺杆菌，如同性恋螺杆菌、犬螺杆菌及芬纳尔螺杆菌，在使用商品化的血培养仪时，偶尔可从疑似菌血症患者的血液中分离培养出来[如 the Bactec system(BD, Sparks, MD)]。这些菌株通常仅在需氧培养瓶中生长，但是当培养瓶报阳需要进一步检测到这些螺杆菌时，会较难处理，因为此类菌一般难以通过显微镜观察到。传代培养后，如果培养皿不放置于微需氧环境下并延长培养时间(最少 6 天)，菌落可能难以生长。螺杆菌菌种从其他的无菌体液中分离到非常罕见，一个典型例子就是在关节液中采用非选择血培养皿分离出一株同性恋螺杆菌[73]。

八、鉴定

螺杆菌种的鉴定一般依据有限的形态学、生理学与生化特征(表 59-2)。螺杆菌各菌种在血平皿上呈不同菌落表型特征，有散在、灰白色、半透明的幽门螺杆菌菌落，也有聚集分布的某些胃螺杆菌(如猫螺杆菌)。许多螺杆菌有运动力，应根据推荐的程序常规检测氧化酶、触酶与脲酶活性[74]。

(一)幽门螺杆菌与其他胃螺杆菌

胃活检样本的染色中，幽门螺杆菌通常弯曲或螺旋形。但是，在传代培养后，这种“典型”形态特征经常丢失。经革兰染色，幽门螺杆菌可呈弯曲形、U 形甚或直杆菌。HHLO 菌菌体较大，胃活检样本的组织学检查可见其呈明显的螺旋形[51]。螺杆菌在传统革兰染色时着色较弱，为了更清楚的视野，需要延长 0.5%石炭酸品红复染时间。脲酶阴性的螺杆菌可能偶尔从胃活检样本中检出，如同性恋螺杆菌，虽然这类细菌从未分离培养过，但是已经为 DNA 检测所证实[75]。因此，重要的是要进行其他的关键生化试验来鉴定非常规菌株，如使用乙酸吲哚吩水解试验与触酶试验。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)可快速鉴定幽门螺杆菌；然而市场上可获得的 FDA 批准的数据库目前并不包括幽门螺杆菌。研究数据库或符合欧标(Conformité Européenne, CE)的数据库包含幽门螺杆菌和其他容易培养的螺杆菌(例如，同性恋螺杆菌、鸡螺杆菌、犬螺杆菌、加拿大螺杆菌)的质谱指纹。一项使用 Vitek-MS 鉴定螺杆菌的研究表明，其与 16S rRNA 鉴定的一致性仅为 10%。研究中出现错误鉴定或无法鉴定[76]。根据笔者实验室使用布鲁克 Biotyper 和 RUO 数据库鉴定螺杆菌的经验，大约 20%的幽门螺杆菌可以被鉴定，而 80%的菌株需 16S rRNA 测序最终鉴定。需要扩充 *H. pylori* 的质谱数据库，以更好确定这种鉴定方法可否常规使用(尤其是现有质谱库)。MALDI-TOF MS 已被用于准确鉴定同性恋螺杆菌，并可能进一步提供同性恋螺杆菌亚种分型能力[77]。

(二)肠肝螺杆菌

肠肝螺杆菌可呈聚集形薄膜样菌落(如同性恋螺杆菌与芬纳尔螺杆菌)或者散在单个菌落(如加拿大螺杆菌与鸡螺杆菌)。光学显微镜下，这些菌的外观与其他的革兰阴性螺旋性菌或弯曲菌相似。肠肝螺杆菌各菌种具有几个明显的特征(表 59-2)，应根据推荐的步骤进行生化反应与耐受试验[47]。从人的样本分离的无脲酶活性的肠肝螺杆菌的菌种，如加拿大螺杆菌、犬螺杆菌、同性恋螺杆菌、芬纳尔螺杆菌及鸡螺杆菌，形态与肠道弯曲菌相似，仅依靠外型不可能做出明确的鉴定。可用的鉴定试验包括 42℃生长试验，此条件下同性恋螺杆菌与芬纳尔螺杆菌均培养阴性，此外还有吲哚酚乙酰盐水解试验(indoxyl acetate hydrolysis)，空肠弯曲菌与大肠弯曲菌为阳性，而鸡螺杆菌为阴性。PCR 试验可鉴定出鸡螺杆菌[44]，但是该试验不能鉴别鸡螺杆菌与加拿大螺杆菌。而加拿大螺杆菌可以特征性水解吲哚酚乙酰盐并有萘啶酸耐药，可与之鉴别[47]。犬螺杆菌与其他的螺杆菌不同，触酶阴性，脲酶也阴性，这些特征使其与“温厄姆螺杆菌”及胆汁螺杆菌容易混淆。42℃生长试验、硝酸盐还原及吲哚酚乙酰盐水解试验有助于将犬螺杆菌从其他的触酶阴性的弯曲杆菌中鉴别出来。需要重要提醒的一点是，粪便样本偶尔可定植多种螺杆菌与弯曲杆菌菌种，因此对检测结果全面评估、准确诊断比较困难。螺杆菌菌种特异性 PCR 试验有助于鉴定，明确的种水平确诊需要进行 16S rRNA 基因测序。然而，16S

rRNA基因种系进化树分析不适用于区分相关性密切的菌种，如HHLO就不可藉此鉴别[13]。

九、分型方法

(一)幽门螺杆菌分型方法

幽门螺杆菌菌株的分型对患者诊治中没有直接的作用[52]。即便如此，菌株分型数据可在以下情况中提供帮助：监测治疗效果；鉴别持续性感染是因幽门螺杆菌根治失败所致，还是因再次感染所致；研究菌株型别与患病严重程度；开展幽门螺杆菌传播途径与传播模式流行病学研究；研究世界范围内幽门螺杆菌菌株的祖系特性，这种特性可能与疫苗的研发相关。目前还没有公认的幽门螺杆菌菌株分型系统。尽管有许多种不同的方法用于幽门螺杆菌分型，经评估，基因分型法是应用最广泛的鉴定幽门螺杆菌菌株类型的方法。幽门螺杆菌的关键特征是高度的基因多样性，几乎每一个菌株都具有独特的基因型，这源于该菌基因组内多样化，并出现天然同源重组[29]。目前认为基因多样化有助于幽门螺杆菌在慢性感染中持续存活，并适应胃部新环境。

空泡毒素基因(vacuolating cytotoxin，*vacA*)具有高度的多态性，为采用推荐引物、并得以广泛应用的PCR基因分型方案提供了基础[78]。*vacA*等位基因类型的确认主要根据信号区域或中间区域是否插入短片段、保守的核酸序列[79]。全球范围*vacA*等位基因类型通常为s1/m1(空泡型，vacuolating)、s1/m2(选择性空泡型，selectively vacuolating)及s2/m2(非空泡型，nonvacuolating)。信号区的等位基因可进一步分为s1a、s1b、与s1c亚型；同样，中间区可分为m2a与m2b亚型[80]。基因分型可使用个体PCR，也可使用多重PCR进行检测[81-82]。分子生物学指纹方法(molecular fingerprinting methods)可用于幽门螺杆菌分析，这些方法包括蛋白电泳谱(electrophoretic protein profiling)、核糖体分型(ribotyping)、限制性片断长度多态性分析技术(restriction fragment length polymorphism analysis)、脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis，PFGE)、扩增片段长度多态性分析(amplified fragment length polymorphism)，以及质粒谱分析(plasmid profiling)[80]。多位点序列分型(multilocus sequence typing，MLST)可能是应用最广泛的幽门螺杆菌分子亚型分型方法；这种方法曾经用于研究幽门螺杆菌的家庭内部传播[83]，以及该菌在全球的流行病学模式[82]。PubMLST数据库目前有各地区的2000种幽门螺杆菌ST型。下一代测序已经应用于幽门螺杆菌快速测序及小鼠模型幽门螺杆菌单菌株的基因组研究，提供了存在于一个菌株中的基因组多样性[84]。研究还使用下一代测序来确定不同幽门螺杆菌菌株的来源和潜在毒力[85]。

(二)其他螺杆菌分型

除幽门螺杆菌外，不太可能需要对其他螺杆菌进行分型，而且曾经报道的基因分型方案在常规应用中也有各种各样的问题。

十、血清学试验

(一)血液中检测幽门螺杆菌抗体

幽门螺杆菌感染可诱导机体产生对多种抗原的特异性全身免疫反应，仅有2%的患者不出现血清转换，无抗体出现[86]。典型的免疫反应为特异性IgM抗体的一过性增高，随后IgG与IgA抗体增高，这种增高可贯穿感染的整个过程。血清学试验广泛用于幽门螺杆菌感染的初筛，因为该方法简单且无侵入性。然而疾病治愈后会出现血清抗体持续阳性的现象，因此用血清学方法检测当前/活动感染在大多数人群中的诊断价值有限。尽管这种检测的样本类型(即血清)很方便获得，但最近的幽门螺杆菌感染治疗指南(由美国胃肠病学会出版)明确指出，只有当患者有消化性溃疡病史时，血清学试验才是可接受的；这极大地限制了幽门螺杆菌血清学评估在特定人群中的应用[87]。在低患病率人群中，由于结果不准确的可能性增加，不建议对幽门螺杆菌进行血清学试验。Maastricht Ⅳ共识报告(Maastricht Ⅳ Consensus Report)指出应限制使用血清学试验，只有经过验证检测试剂的准确度＞90%后才推荐用于临床检测。然而，商品化检测试剂和当地幽门螺杆菌流行株变异性之间的不同，应用此种商品化检测试剂进行血清学试验的价值尚待商榷，尤其是考虑到可以采用其他可替代的检测活动性感染非侵入性方法[52]。

过去的20年间针对幽门螺杆菌抗体检测开发了许多实验室自制试验及商品化试剂盒，主要采用的实验室检测方法为标准ELISA方法。在一些综述与meta分析中，实验室ELISA试剂盒[如Cobas Core enzymeimmunoassay (Roche, Mannheim, Germany)]及快速床旁免疫层析法[如FlexSure HP (Beckman Coulter Inc., Brea, CA)]等方法的性能与诊断能力已经得到了严格的评估[22]。根据综合性能评价，推荐应用检测IgG抗体的血清学(ELISA)试剂盒作为诊断幽门螺杆菌感染的推荐方法[22,52]。试验中IgA与临床感染相关性存在争议[88]。有研究者观察到IgA的性能与IgG一致，但是最近的一篇评估研究认为单独应用IgA指标诊断的总体敏感性与特异性较差，而对儿童样本检测的性能优于成人样本[88]。一般来说IgM诊断感染的价值较小，其敏感性过低，难以令人满意[88]。

治疗后随访时不推荐使用血清学试验，应选用检测活动性感染的试验[86]。治疗幽门螺杆菌之后抗体滴度缓慢下降，因此，一份血清样本无法鉴别是既往感染还是现行感染。成功根治幽门螺杆菌感染5年之后，有30%的患者血清IgG抗体水平依旧升高[89]。因此，该试验的假阳性结果将会导致疑似幽门螺杆菌感染患者的过度治疗，这在患病率较低的人群中尤其如此。血清学试验可用于幽门螺杆菌感染的流行病学研究，但是，同样应考虑到一些检测结果阳性，但是没有活动性感染的人。

(二)临床样本中检测其他螺杆菌抗体

诊断人体感染胃HHLO与肠肝螺杆菌时，并不常规使用血清学试验，而且目前并无批准的IgG或IgA试验可用于检测。有报道称同性恋螺杆菌与芬纳尔螺杆菌可引起持久的针对多抗原的免疫球蛋白反应。

十一、抗菌药物敏感性试验

(一)幽门螺杆菌抗菌药物治疗与耐药情况

选用何种合适的抗菌药物根除治疗幽门螺杆菌主要取决于当地克拉霉素的耐药率。根治幽门螺杆菌首选方案为三联疗法，包括质子泵抑制剂、克拉霉素及阿莫西林或甲硝唑二选一[52]。采用抗菌药物标准治疗方案根治幽门螺杆菌感染失败的主要原因是克拉霉素耐药[86]。监测当地克拉霉素的耐药率十分重要，如果克拉霉素耐药率达到一定范围(推荐阈值为15%～20%)，不应该使用该抗菌药物，或者应在使用前进行药敏试验[52]。2004年，美国的克拉霉素的耐药率可达到13%[90]，而在欧洲地域差异较为明显，北欧、中欧与南欧地区的克拉霉素耐药率分别为8%、19%及22%[91]。抗菌药物耐药对临床的影响非常显著，能使标准治疗方案的根治率下降70%(由88%降至18%)[86]。克拉霉素耐药的关键因素为治疗前使用过大环内酯类药物，而且治疗失败后耐药率非常之高。甲硝唑也是三联疗法中关键的用药，对甲硝唑耐药也是普遍的问题。据估计甲硝唑耐药可使治疗成功率下降26%[92]。其耐药率美国为25%[90]，欧洲为29%～44%[91]。在一些其他的国家，耐药率高达60%～90%。值得注意的是，甲硝唑体外耐药不一定准确反映体内耐药的情况，因为幽门螺杆菌生长的气体条件和甲硝唑最佳作用时的气体条件不同(微需氧和厌氧)[92]。因此，Maastricht Ⅳ指南及CLSI中[52,93]，并未推荐进行常规药敏试验。然而，实验室药敏试验对于监测耐药情况非常重要，因为40%人群中的耐药阈值为决定治疗方案提供了指导[52]。

在美国与欧洲地区，幽门螺杆菌对治疗中应用的其他抗菌药物罕见有耐药(<1%)，如阿莫西林与四环素(二线治疗用药)[90-91]。而有报道称，在某些亚洲人群中幽门螺杆菌对这两种抗素的耐药率较高[94]。两类抗菌药物作为三线用药(挽救治疗)用于治疗幽门螺杆菌感染：一种是氟喹诺酮类抗菌药物，如左氧氟沙星，另一类是利福霉素抗菌药物，如利福布丁。氟喹诺酮类抗菌药物应用的增加可以导致幽门螺杆菌的耐药率增高，在美国，其对于左氧氟沙星的耐药率目前已经达到约9%[95]，在欧洲为8%～19%[91]。目前并未发现幽门螺杆菌对于利福布丁的耐药[91,96]，然而该药仍然是有限制地应用于幽门螺杆菌的根除治疗。呋喃唑酮治疗幽门螺杆菌的有效性也曾经有过评估[97]，但耐药率方面的数据缺如。

(二)幽门螺杆菌培养物的表型药敏试验

根治幽门螺杆菌前，应对胃活检样本分离的菌株进行常规抗菌药物药敏试验。特别是克拉霉

素，其体外药敏情况与临床预后密切相关。药敏试验的表型检测方法都可用于幽门螺杆菌，如微量肉汤稀释法、纸片扩散法、Etest及琼脂稀释法。CLSI与欧洲螺杆菌研究工作小组对克拉霉素药敏的琼脂稀释法有相似的推荐折点[91]。进行琼脂稀释法药敏试验时，需要使用含5%老龄绵羊血Mueller-Hinton琼脂培养基，35℃环境培养72 h，MIC耐药折点为1 μg/ml。Etest法（bioMérieux Inc.，Durham，NC）也可以用来确定MIC值[98]，其结果与琼脂稀释法有良好的相关性。纸片扩散法结果不准确，与琼脂稀释法不完全一致，因此，EUCAST或CLSI均不推荐使用[99]。

甲硝唑体外药敏试验就其本质而言并不可靠，因为该试验的实验室内与室间重复性都较差，很难标准化，药敏结果很大程度上依赖于环境的条件[86]。如果其MICs增高（>8 μg/ml）常出现治疗失败，8 μg/ml是通常用于定义甲硝唑耐药的折点[86]。Etest法常用于确认甲硝唑耐药菌株的MIC值，但与肉汤稀释法相比，其结果未必完全正确[86]。目前试行的对于上述抗菌药物的琼脂稀释法的MIC耐药解释标准为：四环素>1 μg/ml，左氧氟沙星>0.5 μg/ml[86,98]。

(三)直接从标本中分离的幽门螺杆菌基因型药敏试验

幽门螺杆菌对克拉霉素的耐药主要是因为23S rRNA基因V域肽基转移酶基因区某些位点发生点突变（A2142G与A2143G）后，可抑制大环内酯类结合靶点[100]。目前已经研究出几种方法可以快速检测与克拉霉素相关的点突变，包括基因扩增、快速焦磷酸测序或者荧光原位杂交[86]。最开始使用PCR-限制性片段长度多态性分析以检测菌株的相关突变，但是现在定量PCR可提供一种更简单、更快捷的方法。这种方法学改进，使得从胃活检样本中直接检测幽门螺杆菌及检测其对克拉霉素耐药性都有很好的敏感性[62]。定量PCR方法也可通过快速检测16S rRNA基因点突变以确认四环素耐药情况[60]，也可通过快速检测*gyr*A基因喹诺酮耐药决定域的点突变来确定对环丙沙星/左氧氟沙星的耐药性[101]。同样，研发出定量PCR试验，通过快速检测*rpoB*基因的点突变，可以确认利福布丁的耐药情况[102]。与此相比，基于DNA的试验用于检测幽门螺杆菌的甲硝唑耐药时就存在许多问题，其体外耐药的机制尚未完全阐明。NADPH硝基还原酶基因（*rdxA*）以及NAD(P)H黄素氧化还原酶基因（*frxA*）多重无效突变可以诱导耐药，但是这两个基因都没有稳定的标志物可用于体外耐药试验[103-104]。

已经研发有双探针23SrRNA基因的定量PCR试验以用于直接检测粪便样本中的幽门螺杆菌克拉霉素敏感试验[62]。而据报道，其改良的方法，幽门螺杆菌ClariRes试验（Ingenetix，Vienna，Austria），敏感性至少与粪便抗原试验一致，特异性更好。然而，另一项对有症状儿童粪便样本检测的评估报告显示，ClariRes检测法的敏感性仅为63%，与其他检测（如SAT、UBT）一致，而这些其他的检测方法在儿童中也显示出较低的敏感性[63]。美国BIOLINE公司（Meridian Bioscience Inc.，Cincinnati，OH）的分析物特异试剂也可以直接从粪便中检测幽门螺杆菌，此外，还可检测大环内酯类抗菌药物耐药的突变基因。在一项研究中，36%的感染者检测到细菌对大环内酯类药物耐药，而经预测对大环内酯类药物敏感的患者中，86%通过以大环内酯类药物为基础的三联疗法获得临床治愈[64]。虽然需要更多的研究来确定该检测的真实性，但初步研究显示此类试验前景光明，以后将有望实现真正的依靠无创诊断和抗菌药物敏感基因型检测指导临床治疗。

(四)胃HHLO药敏试验

尽管目前有证据表明使用传统的幽门螺杆菌根治方法，可治疗胃炎与消化性溃疡性疾病[51]，以及海尔曼螺杆菌相关的、原发性低度恶性MALT淋巴瘤[40]，但是，对于HHLO最佳治疗方案尚有待确立。尽管有报道称对于HHLO的多个菌株（同一位患者）进行了体外药敏试验，而后来一株菌被鉴定为比佐泽罗螺旋菌[71]，一般来说HHLO不能培养，无法进行药敏试验，因此目前没有资料表明HHLO对于克拉霉素或其他抗菌药物的耐药率。为了明确HHLO治疗的可选择的方案，已有研究表明三联试验可显著减少试验小鼠已受感染的胃部的严重程度[105]。然而，目前尚未研发出用来直接确认胃活检样本中的幽门螺杆菌对于克拉霉素与四环素的耐药情况的PCR试验。

(五)肠肝螺杆菌药敏试验

目前尚无肠肝螺杆菌感染(如同性恋螺杆菌、犬螺杆菌、芬纳尔螺杆菌及鸡螺杆菌感染)的推荐治疗指南。多种抗菌药物单剂给药或联合给药均有成功治疗肠杆螺杆菌感染的前例,但是对于该群个别菌种的耐药率情况,相关数据非常缺乏。对于报道比较常见的同性恋螺杆菌,有效治疗需要长疗程给药,至少2~3周,并使用多种抗生素联合治疗,如使用红霉素、环丙沙星、庆大霉素、左氧氟沙星、四环素与β-内酰胺类抗菌药物[42]。

十二、检测结果的评估、解释与报告

幽门螺杆菌感染治疗前的非侵入性诊断试验,主要包括UBT和SAT,血清学试验不再在诊断中起到可靠作用[22]。根据临床设施条件,可进行内镜检查,并进一步开展快速脲酶试验、组织学试验及胃活检样本的培养。为了在治疗后随访中评估幽门螺杆菌感染状况,推荐应用UBT与SAT试验等非侵入性试验,但是由于血清抗体的浓度在幽门螺杆菌根治后下降缓慢,IgG血清学试验不适于作为随访指标。除了试验性能,其他的因素,如成本效益、患者依从性,均需要在选择随访试验时权衡[106-107]。推荐使用胃活检样本进行幽门螺杆菌的细菌学培养,以用于进行抗菌药物药敏试验,特别是对于多次治疗失败的患者,尤应如此。如果培养菌株为微需氧,革兰染色阴性,氧化酶、触酶与脲酶均为阳性,应报告阳性培养结果。如果经10天培养后仍无菌落生长,应报告培养阴性;但是,如果临床试验提示幽门螺杆菌感染,需要对胃活检样本或粪便样本直接使用菌种特异性PCR试验,这是非常有意义的。然而由于PCR试验存在一定不可靠性,可出现假阳性结果,此类试验不可作为诊断的唯一证据。克拉霉素药敏试验应使用CLSI推荐的方法或者大体上等效的方法。对培养物、活检样本或粪便标本开展直接PCR试验,检测是否存在明确的导致大环内酯类耐药的基因突变,可替代耐药表型试验。幽门螺杆菌根治也可能包括其他的抗菌药物,如阿莫西林、甲硝唑与四环素,对于个别治疗有困难的患者,可能要使用利福布丁、左氧氟沙星及呋喃唑酮(痢特灵),这有赖于当地的临床实际。这些抗菌药物可能存在"试用性"的解释标准,然而在缺乏推荐指南时,应予以采用。

非幽门螺杆菌菌种所致的胃部感染比较少见,可根据胃活检组织样本中菌体的形态学加以诊断。在微生物实验室,此类微生物可使用HHLO特异性PCR试验检测。而肠肝螺杆菌菌种因为缺乏快速诊断的方法,必须进行培养才能明确鉴定。肠螺杆菌种,如加拿大螺杆菌与鸡螺杆菌可能偶尔在采用分离弯曲杆菌菌种时,特别是使用非选择性培养基与37℃条件下培养时,顺带分离出来。由于弯曲杆菌分离菌株的常规鉴定通常并不严谨,可能会导致肠螺杆菌种的遗漏。上述菌种在人胃肠炎中扮演的角色可能并不重要,其检测的临床意义也的确不太清楚。其他菌种,如同性恋螺杆菌、犬螺杆菌及芬纳尔螺杆菌,在血培养与其他感染部位都很难遇到。此类菌种在需氧条件下不可能良好生长,只有在含较多CO_2的环境下,或者在"厌氧"条件下(严格厌氧条件不支持菌落生长)延长培养时间,才有可能培养出菌落。因为这些肠肝螺杆菌为典型的脲酶阴性,可能与弯曲杆菌相混淆,很难做出准确的鉴定,应送至参考实验室进行鉴定。菌株的临床意义可能并不明确,应对每个病例逐个评估。如有需要,应开展抗菌药物敏感试验,以指导抗生素治疗决策。

参考文献请扫二维码查阅

第60章 钩端螺旋体属

PAUL N. LEVETT, RENEE L. GALLOWAY

(李敏 译;鲁炳怀、苏建荣 审校)

一、分类

(一)血清学分类

钩端螺旋体属的细菌是带有钩状末端的螺旋形细菌[1],连同 *Leptonema* 和 *Turneriella* 2个属共同构成钩端螺旋体科,归属于螺旋体目、螺旋体纲、螺旋体门[2]。钩端螺旋体属传统上包括2个种:*Leptospira interrogans* 和 *L. biflexa*,前者包含所有的致病菌株,后者主要包括从环境中分离出的腐生型菌株[3],*L. biflexa* 和 *L. interrogans* 这2种钩端螺旋体可以通过一系列的生化实验进行区分[3]。

钩端螺旋体根据与同源抗原交叉吸附后的凝集反应划分为不同的血清型[4-5]。如果在重复实验中,2个菌株的抗血清用适量的异种抗原进行交叉吸附,2份抗血清中有一份残留的同源抗体滴度仍超过10%,这两个菌株属于不同血清型[6]。目前已鉴定出超过60种 *L. biflexa* 血清型和多于200种的 *L. interrogans* 血清型。各个血清型钩端螺旋体根据抗原相关性又被习惯性地归到不同的血清群中[5]。血清群本身并没有分类学根据,但是这个概念已经被证实在流行病学分析,特别是显微镜凝集试验(microscopic agglutination test, MAT)的血清型结果分析中更加具有实用意义。

(二)基因型分类

钩端螺旋体的表型分类已经被基因型分类所代替,23个基因种包含了所有血清型的钩端螺旋体[1,7]。表60-1列举了钩端螺旋体的所有基因种。DNA杂交实验也证实了特异性 *Leptonema*[8] 和 *Turneriella*[9] 2个属的分类情况。基因型分类的钩端螺旋体菌种有2个种(*L. interrogans sensu lato* 和 *L. biflexa sensu lato*)[10]与以前分类不一致。不管是血清群还是血清型,都很难可靠地预测钩端螺旋体到真正的种。而且,在一些钩端螺旋体血清型中,由于编码细胞表面抗原的基因发生水平转移而产生的基因异质性[8],会导致一些血清型中的菌株被分到多个种中,最明显的是Hardjo血清型的2种基因型(*L. interrogans* Hardjo型 Hardjoprajitno亚型和 *L. borgpetersenii* Hardjo型 Hardjobovis亚型)[11-12]。此外,以前用于把 *L. interrogans sensu lato* 从 *L. biflexa sensu lato* 中区分出来的表型特征将不能用于区分基因水平上鉴定出的钩端螺旋体菌种[8,13]。在基因型分类中,*L. interrogans* 和 *L. biflexa* 被保留为其特定名称,而且在本章中,包括 *L. interrogans sensu stricto* 和 *L. biflexa sensu stricto*,其特定名称指代的是基因水平上定义的菌种。

钩端螺旋体的分类需要对每一株菌进行菌种和血清型鉴定。已经可以通过对保守的管家基因进行测序[14-15]或通过基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)[16]鉴定钩端螺旋体菌种。*rrs* 序列系统进化分析结果表明钩端螺旋体有三大进化分支,分别代表着致病株、腐生株和致病性不明株(图60-1)。从典型的参考菌株开始,已经完成了几百菌株的基因组测序[15]。越来越多基因组的获得,代表了广泛的菌种来源,这使得以基因测序为基础来确定血清型的分析方法成为一种可能。

表 60-1 钩端螺旋体基因种

系统进化簇[a]	基因种
致病型	*L. alexanderi*
	L. alstonii
	L. borgpetersenii
	L. interrogans
	L. kirschneri
	L. kmetyi
	L. mayottensis
	L. noguchii
	L. santarosai
	L. weilii
中间型	*L. broomii*
	L. fainei
	L. inadai
	L. licerasiae
	L. venezuelensis
	L. wolffii
腐生型	*L. biflexa*
	L. idonii
	L. meyeri
	L. terpstrae
	L. vanthielii
	L. wolbachii
	L. yanagawae

注：[a] 基于 16S rRNA 基因测序（图 60-1）

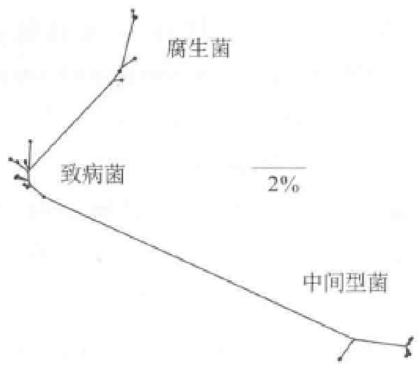


图 60-1 钩端螺旋体菌属之间系统进化关系，基于 *rrs*（16S rRNA 基因）序列分析。刻度尺代表 2%序列差异

二、概述

钩端螺旋体是一种紧密盘绕的螺旋体，通常直径 0.1μm，长度 6～20 μm，其螺旋构象属于右手螺旋，其振幅为 0.1～0.15 μm，波长大约 0.5μm[17]。钩端螺旋体在形态上具有锐利的尖端，其一端或两端常会弯曲成独特的钩状（图 60-2）。菌体上的两根轴向细丝（周质鞭毛）以极性方式插入到壁膜间隙中。钩端螺旋体具有 2 种不同的运动方式：平移型（快速前后移动）或转动型（围绕菌体本身的长轴快速旋转移动）[17]。无法从形态上区分所有钩端螺旋体菌种。

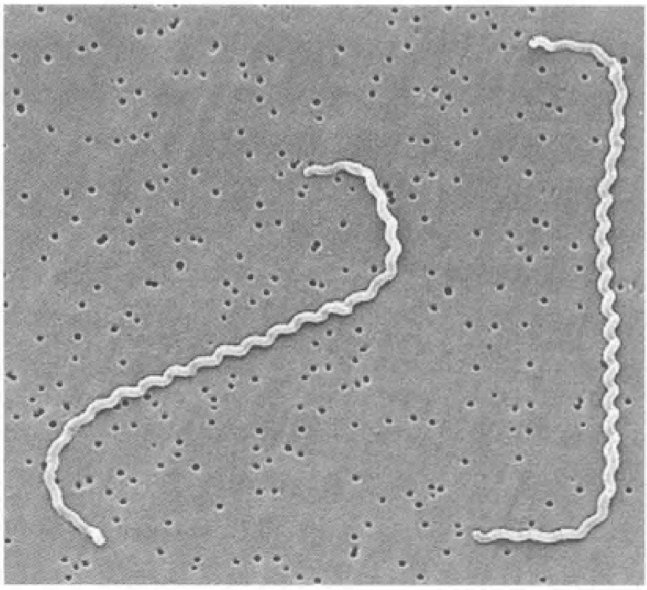


图 60-2 被固定于 0.2 μm 滤膜的钩端螺旋体扫描电镜照片。放大约 3500 倍（来源：公共卫生图像图书馆）

钩端螺旋体是一种专性需氧菌，其最适生长温度为 28～30℃。最适 pH 7.2～7.6。能够产生触酶和氧化酶。可以在富含维生素（维生素 B_2 和维生素 B_{12} 是其生长因子）、长链脂肪酸和铵盐的基础培养基中生长[3]。

三、流行病学与传播

钩端螺旋体无处不在，既可以自由生长在水中，也与动物的肾定植相关。钩端螺旋体病可能是世界上传播范围最广的一种动物传染病[18]，估计每年在全球范围内引起超过 100 万例病例[19]。人类感染钩端螺旋体病的方式通常是直接或间接接触了被感染动物的尿。气候温暖的国家中，钩端螺旋体病发病率一般比温带地区更高，这主要是因为钩端螺旋体在温暖潮湿的环境中存活时间更长。同时，钩端螺旋体病还具有季节性，在温带地区，温度会成为钩端螺旋体存活的一种限制性因素，其发病率一般在夏季或者秋季达到顶峰；而

在温带地区，钩端螺旋体发病率一般在雨季达到顶峰，非雨季时，干燥的气候会不利于钩端螺旋体存活。

动物，包括人类，可以被分为储存宿主和偶然宿主。储存宿主通常指发生地方性传染病的一类物种，常通过直接接触在动物之间转移。此类宿主往往在早年便受到感染，随着年龄的增加，尿中慢性分泌物的流行率也增加。其他动物（比如人类），在与储存宿主的间接接触中也能被感染。有些动物可能是某些钩端螺旋体血清型的储存宿主，也可能是另外一些钩端螺旋体血清型的偶然宿主，一旦感染，可能会引起严重的或者致命性的疾病。钩端螺旋体最重要的储存宿主是小型哺乳动物，可将感染转移给家畜、狗和人。不同的啮齿动物可能会是不同血清型的储存宿主，但是大鼠通常是 *Icterohaemorrhagiae* 血清群所有血清型的储存宿主，而小鼠则是 *Ballum* 血清群所有血清型的储存宿主。家畜同样也是储存宿主；奶牛可能携带 *Hardjo* 和 *Pomona* 血清型，猪可能携带 *Pomona*、*Tarassovi* 和 *Bratislava* 血清型，狗可能携带 *Canicola* 血清型。储存宿主及其携带的细菌血清型在全世界范围内有明显差异，且这些差异会随时间改变。

明确钩端螺旋体主要流行血清型及其储存宿主对于了解钩端螺旋体病的流行病学情况很有必要。例如，在过去 20 多年里，北美东北部地区的犬类钩端螺旋体病发病率一直处于上升状态，血清学和分子特征表明这很大程度上是由 *Grippotyphosa* 血清型导致的[20-22]。同时，流行病学方面的证据表明浣熊[23]和臭鼬可能是此钩端螺旋体血清型的储存宿主。大多数病例都聚集在新开发的郊区区域[21]。这一流行病学方面的变化促使 *Grippotyphosa* 和 *Pomona* 血清型被纳入犬类疫苗研发中[24]。

人类感染钩端螺旋体可能通过职业或娱乐暴露而获得。工作环境一直是人类感染钩端螺旋体病的重要危险因素。对农民、兽医、屠宰工人、啮齿动物管理人员和其他需直接和动物接触的工作群体而言，直接与被感染动物接触是最主要感染方式。而在下水道工作人员、矿工、士兵、脓毒罐清理员、渔民、水稻种植人员和甘蔗切割人员等工作群体中，间接接触是重要感染方式。在全球范围内，畜牧业养殖是主要的职业危险因素。水上运动中的娱乐性暴露也是一个显著的危险因素[25]。冒险运动和生态旅游的盛行也提高了旅游者中钩端螺旋体病的发病率[26-27]。

四、临床意义

钩端螺旋体通常是通过皮肤上的伤口或者是黏膜侵入机体。绝大多数的感染都呈亚临床状态或症状非常轻微，所以患者也大多不会寻求医疗护理。钩端螺旋体感染的临床症状具有双相性，先是持续 1 周的败血症阶段，接下来是免疫反应阶段，此阶段以抗体的产生和尿中钩端螺旋体的排出为特征。钩端螺旋体病引起的并发症主要与钩端螺旋体在机体免疫阶段所定植的组织有关，因此，并发症一般发生在钩端螺旋体病发病后的第 2 周。

临床上，几乎所有被确诊的患者都会伴随着突然出现的发热，其症状包括寒战、头痛、肌痛、腹痛和结膜充血。在所有的钩端螺旋体病病例中，有≤25%的患者会出现无菌性脑膜炎，有 5%～10%的患者会出现黄疸症状（Weil 病），这类患者不仅发生黄疸，还可能并发急性肾衰竭、肺出血和心律失常等症状。而对于危重病例，其严重症状一般在钩端螺旋体病的晚期阶段出现，同时会导致高死亡率，为 5%～15%。尽管少见，一些患者会表现出咯血和肺部症状[28]，并快速进展为严重的肺部出血症状[29]。

五、标本的采集、运送和储存

钩端螺旋体能够在发病后的 10 天内从血液、脑脊液（CSF）和腹膜透析液中分离出来。标本采集应在患者发热时，以及抗菌药物治疗前进行。在适当条件下，可以在患者床边直接取 1～2 滴静脉血接种到培养基内。已有报道称，在商业化的血培养基内，钩端螺旋体可以存活数日[30]。在标本运送方面，目前还没有有效的运送培养基，但可直接采集患者血液，注入含有肝素、草酸盐或柠檬酸盐的抗凝管中室温送检[31]。如果标本要用于后续的 PCR 反应，最好用含有柠檬酸盐或 EDTA 的抗凝管，因为肝素、聚茴香脑硫酸钠或皂角苷对 PCR 反应有抑制作用[32-33]。

在发病的第1周内也可以采集尿培养。尿样本需要无菌性采集于不含防腐剂的无菌容器中，尿样采集后尽快接种培养，最好不要超过1 h。如果尿样本不能做培养，只是用于PCR检测，可以在室温条件采用商业化试剂稳定样本，这样可以实现长距离运送[33]。

六、直接检测

(一)显微镜检查

临床样本中的钩端螺旋体可以通过暗视野显微镜(放大倍数×100和×400)，或免疫荧光，或适当染色后用光学显微镜等方式观察。用暗视野显微镜对血液、尿、脑脊液或透析液等体液进行检测时，敏感性和特异性都较低[34]。只有当样本中含有10^4钩端螺旋体/ml时，暗视野显微镜下可见1个细菌/视野[35]。另外，在用暗视野显微镜观察血液样本时，其结果还会被做布朗运动的纤维蛋白或蛋白团所干扰[31-35]。组织中的钩端螺旋体最开始用银染方法检测[36]，而后病理组织学检测更多用Warthin-Starry染色法。在近些年，免疫组化的方法也得到应用[37-38]。乔治亚州亚特兰特市的疾病预防控制中心已开展免疫组化方法(在送检样本前请先与传染病病理科联系；e-mail pathology@cdc.gov)。

(二)抗原检测

抗原检测方法普遍被认为是一种敏感性不高的方法，目前还没有商业化的抗原检测方法。

(三)核酸检测

PCR方法已经广泛应用于钩端螺旋体的检测。钩端螺旋体的DNA已从血液、血浆、血清、尿、房水、脑脊液和尸检的组织中被扩增出来[39]。

从临床应用效果来看，PCR检测钩端螺旋体DNA的方法与培养鉴定法的敏感性相当或更高[40-43]，而在急性发病期和恢复期时，运用MAT方法对患者进行血清学试验其敏感性更高[41,43]。PCR方法的主要优势是可以在急性发病期明确诊断，以便更有效地进行治疗[44]。

Real-time PCR的方法可以用于检测患者和动物模型中感染组织的细菌载量[43,45-47]，也可以用于常见种的鉴别[48]。但基于PCR诊断钩端螺旋体病的一项限制因素是，PCR方法不能区分钩端螺旋体血清型。虽然血清型的鉴定在个体患者的治疗中并不重要，但在流行病学和公共卫生方面则具有重要价值。

七、分离程序

钩端螺旋体败血症一般在钩端螺旋体病的第一阶段出现，在钩端螺旋体病典型症状出现前发生，结束于钩端螺旋体急性发病期的第1周末[49]。因此，一旦患者出现了症状，则要尽快进行血培养。进行培养时，可以在患者床边，取1～2滴血(大约50 μl)接种到10 ml含有0.1%琼脂和200 μg/ml 5-氟尿嘧啶的半固体油酸-白蛋白培养基上[50-51]，如Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris培养基(EMJH；Difco，BD Diagnostic Systems，Sparks，MD)。接种时可以直接滴加在培养基的表面，无需混合。但要注意避免接种过量，因为血液中含有抑制钩端螺旋体生长的因子。为了增加培养阳性率，必须多次取血进行培养，而这实际上很难实现。因为有报道钩端螺旋体在商业化的血培养基内可以存活长达1周[30,52]，因此，在钩端螺旋体病未确诊时，如果得不到其他的样本，血液培养样本可用于PCR检测。

在发病的第1周内，除了血液，也有其他样本可以用于培养，包括脑脊液和腹膜透析液。而在疾病症状出现后的第2周起，可以采集尿进行培养。由于钩端螺旋体在患者排出的尿中很难存活，因此，需要在取得尿样本后，尽快用碳酸氢钠溶液中和尿pH，然后转移样本至15 ml离心管中，1500×g离心30 min，将沉淀重悬于1 ml PBS缓冲液中，取1～2滴接种到上述的含有5-氟尿嘧啶的半固体EMJH培养基中。

用EMJH培养时，可以置于28～30℃环境中孵育，暗视野显微镜每周检测1次，持续13周，而后丢弃。通常，生长的钩端螺旋体可以在培养基表面的下方形成一个数毫米的离散带，也被称为“Dinger环”。如果在培养过程中有其他杂菌生长，要先用0.2 μm或0.45 μm的滤膜过滤，而后再转种到新的培养基中。

八、鉴定

分离出的钩端螺旋体可用血清学方法鉴定，

也可用基于测序的技术来鉴定。传统的鉴定方法主要依赖于交叉凝集素吸附[4]。很少有实验室能够采用以上这些方法进行鉴定。而单克隆抗体面板的应用，使能够开展 MAT 方法的实验室可以对常见的钩端螺旋体血清型分离株进行快速鉴定[53]。单克隆抗体可以从位于荷兰阿姆斯特丹市阿姆斯特丹大学医学院的 WHO/OIE 钩端螺旋体病参考中心获得。

当前钩端螺旋体分类系统需要同时在菌种和血清型两种水平上对钩端螺旋体进行鉴定。钩端螺旋体菌种鉴定绝大多数是基于序列分析确定的[54]，使用 *rrs*（16s rRNA）基因[55]、*gyrB* 基因[56]、*rpoB* 基因[57]、*flaB* 或者 *secY* 基因[58]。另外，采用 MALDI-TOF MS 鉴定钩端螺旋体也已有报道[16,59]。

九、分型系统

由于利用血清学方法对钩端螺旋体分离株进行鉴定存在一定困难，现在利用分子生物学方法进行鉴定和分亚型得到了越来越多的关注[54,60]。这些分子生物学方法包括限制性内切酶对染色体 DNA 的酶切消化、限制性片段长度多态性、脉冲电场凝胶电泳分析[61-62]、核糖体分型及一系列的基于 PCR 反应的方法[54]。测序成本的降低和生物信息工具的可用性使得它们有望取代其他的分型方法。公共数据库 http://pubmlst.org/leptospira/[63]，拥有 3 种钩端螺旋体的多序列位点分型方案，包含近 600 种分离株，可通过全基因组或单基因序列进行查询[64-67]。其他基于测序的方法，例如，可变数目串联重复序列分析和下一代测序，也可用于钩端螺旋体分型。这些方法的应用将有助于人们更深入地了解钩端螺旋体种群水平上的流行病学[22,54,68-71]。

基于测序的分型方法，已经能直接从临床标本中检测和鉴定钩端螺旋体，但是成功的分子表达谱所要求的细菌载量比较高[72-74]。

十、血清学试验

绝大多数钩端螺旋体病是用血清学的方法诊断的。在症状开始后的 5～7 天时，血液中即可检测到抗体。MAT 仍是用于确诊钩端螺旋体病的血清学方法，进行 MAT 实验时，将患者血清与不同血清型的钩端螺旋体抗原悬浮液共同孵育，而后在显微镜下观察血清-抗原混合物凝集情况，最后确定滴度。无论是在对照，实验过程，还是结果分析上，MAT 都是个复杂的实验[75]，并且其使用范围局限于国家或地区的参考实验室。MAT 的操作规程已在相关文献中详细论述[31,76]。鉴于此，由国际钩端螺旋体病协会发起的、各实验室参与的一项国际能力验证计划，极大地促进了各实验室对 MAT 实验质量的提升[77]。MAT 实验过程中使用的抗原应包括在所有血清群中具有代表性的血清型[31,75]。所使用的抗原种类越多，越能检测出不常见的、或以前未检测出的钩端螺旋体血清型。实验结果需要在暗视野显微镜下读取。当血清最高稀释组出现 50％的凝集时，实验终止，通过与对照组比较约 50％游离的、未发生凝集的钩端螺旋体数得到最终结果[31]。即使在一个实验室内，也需要付出很大努力来减少因观察者不同而对结果判读带来的主观性差异。

不同血清型之间出现的较高水平的交叉反应，使对 MAT 结果的分析变得复杂，尤其是在急性发病期样本中。同时，一些异常反应也经常出现，比如，样本中检测到有最高滴度的血清群与有感染性的血清群并不相关[10]。当同时使用 IgM、IgG 抗体和几种常见钩端螺旋体抗原进行 MAT 时，急性发病期的临床样本发生交叉反应的概率最高，其次是恢复期的临床样本[78]。

如果要确保血清学诊断结果的准确性，通常需要检测双份血清。当双份血清间出现 4 倍甚至更高的滴度的上升时，不管取样间隔为多大，都可以确定血清学诊断结果的正确性。第一次和第二次取样时间很大程度上取决于患者开始出现症状和全面发病间的时间间隔。当钩端螺旋体病的典型症状开始出现时，3～5 天的取样间隔可以充分确保观察到滴度的上升。然而，如果患者的症状出现较早，或者症状出现的时间不明确，那么 10～14 天的取样间隔更为合适。在极少的一些病例中，血清指标转变较慢，那么此时需要加长取样时间（或重复取样）。MAT 血清学实验是相对不灵敏的，尤其对于早期急性发病期的样本[79-80]。此外，暴发性钩端螺旋体病患者可能在血清指标发生转变之前就已去世[80-81]。

若一个急性发热的病例同时发现血清中单一抗体滴度上升，可以推定诊断为钩端螺旋体病。此滴度的大小依赖于人群暴露（于钩端螺旋体）的背景水平及由此导致的血清阳性率。

急性感染后的滴度可能会非常高（≥25 600），并且可能需要几个月甚至是几年的时间才能回落到低水平[82-83]。因此，在高发性人群中，用低临界值的滴度来做推定诊断是不合适的，会产生很多假阳性诊断。在地方性发病区域，若有症状患者的单个效价≥800，基本上预示着患者患了钩端螺旋体病，但还是推荐≥1600 的效价值作为诊断依据[76]。少数情况下，患者恢复后血清指标延迟几周发生变化，因此，为了证实诊断结果的准确性，还需要更长时间的血清学随访。

在 MAT 实验中，已有使用福尔马林处理灭活的抗原，来克服活性抗原使用中的一些难题。使用灭活抗原时，其效价多少有点低，并且会检测到更多的交叉反应[31]。灭活抗原并不能通过商业渠道获得，但可以从世界卫生组织合作中心取得。

在流行病学的血清学调查中，MAT 试验是最合适的方法，因为其可以用于所有动物种类的血清，并且可以根据需要增加或者减少抗原使用范围。通常使用≥100 的滴度作为曾经暴露于感染原的依据[75]。与普遍观点相反的是，MAT 实验是一种血清群特异性试验。然而，如果没有临床分离菌株，单靠 MAT 实验，并不能得出是哪种血清型感染的结论，至多得知出现的是哪种血清群[84-86]。

由于 MAT 实验的复杂性，在急性发病期，针对钩端螺旋体抗体的快速筛选实验已经得到发展和应用。基于凝集反应的传统方法已经在很大程度上被 IgM 检测实验所代替。在患者发病的第 1 周内，IgM 抗体即可被检测到，此时确定诊断结果并启动治疗对钩端螺旋体病治疗最有效。在急性发病期，如果第一份样本的取样时间较早，应用 IgM 抗体检测会比 MAT 实验具有更高的敏感性，此结果已被多次证实[80,87-88]。IgM 试纸法被证实与 IgM-ELISA 微滴定板法敏感性相同[89-91]。此外，还有其他快速检测方法，包括乳胶凝集试验[92]和侧向层析试验[93]。

十一、抗菌药物敏感性试验

钩端螺旋体对很多抗菌药物敏感，包括 β-内酰胺类、大环内酯类、四环素类、氟喹诺酮类及链霉素类。钩端螺旋体的抗菌药物敏感性测定还存在很多问题，包括培养所需的时间长[94]、含血清培养基的使用[95-96]，以及精确定量其生长情况的困难等。这些问题都限制了快速化、标准化抗菌药物敏感性试验方法的发展。不过，之前报道过的肉汤微稀释法[97]，可以检测大量临床分离株对多数抗生素的敏感性[98]。这些研究可以帮助发现能用于临床的新抗菌成分。最近，E 试验被用于生成抗菌药物敏感性数据[99]。

评估钩端螺旋体病治疗效果临床试验的荟萃回顾性分析，无法得出抗菌药物治疗益处的结论，这可能主要是因为患者的疾病严重程度不一。但是不管如何，静脉注射青霉素、头孢菌素、多西环素、阿奇霉素被认为是适宜的治疗方法[100-103]。同样的，预防性的每周 1 次口服多西环素可以在高风险环境中提供短期保护，并且可以有效预防钩端螺旋体病这一观点已经得到广泛认可[100]，但临床试验还未能证明预防性措施的效果[104]。

十二、诊断结果的评估、分析和报告

钩端螺旋体病的诊断方法有多种，包括分离出病原体，从血、尿或其他标本中扩增出钩端螺旋体 DNA，组织中钩端螺旋体的免疫组化染色阳性，以及在同一时间、同一操作方法下，急性发病期血清和恢复期血清的抗体效价具有 4 倍及以上增加等。在钩端螺旋体病不流行的人群和区域中，对于出现症状的患者，如果一次取样的检测滴度≥200，那么可以基本确定其患有钩端螺旋体病，但不能确定是急性钩端螺旋体病还是近期患过钩端螺旋体病。若出现相应症状，且滴度≥800，则强烈提示为近期或现症感染。延迟性血清指标变化较为普遍。通过检测 IgM 抗体可以初步诊断患者患有钩端螺旋体病，但由于 IgM 抗体的持续性，此诊断还需要其他方法，比如 MAT 方法加以证实[83]。若患者出现典型症状，但检测结果为阴性，并不能排除钩端螺旋体病，需要进一步检查样本。血清学方法不能很好区分是否为现症感染，相比之下，分离培养钩端螺旋体、分子生物学方法检测钩端螺旋体 DNA，以及免疫组化染色方法检测组织中的钩端螺旋体可以确诊和区分患者是现症感染还是既往感染。

虽然当前分子生物学方法和快速血清学试验方法在鉴定钩端螺旋体方面取得了很大的进步，但在全球范围内，具备钩端螺旋体诊断技术的实验室仍然较少。在美国，钩端螺旋体病已于 2013 年 1 月份恢复为国家法定传染病。样本提交和病例报告的相关指导可以在 CDC 网站上获得（http://www.cdc.gov/leptospirosis/），更多的有关钩端螺旋体病的信息可以通过钩端螺旋体图书馆网站上获得（http://leptospira.amc.nl/leptospira-library/），此外，最新的国际上钩端螺旋体病诊断检测中心专家意见列表可以在国际钩端螺旋体病协会网站上获得（http://www.leptosociety.org/）。

参考文献请扫二维码查阅

第 61 章　疏螺旋体属*

MARIA E. AGUERO-ROSENFELD，GEROLD STANEK

（许建成　译；杜鸿　审校）

在过去几年中，人们已经收集了关于疏螺旋体属（*Borrelia*）的大量新信息。这一组微生物的所有成员都在自然界中的动物宿主中保存，并通过节肢动物媒介传播。大多数种的传播仅限于其地方性兽疫流行周期，只有少数种会因被感染的载体叮咬而导致人类疾病。疏螺旋体的系统发育、微生种群及其与节肢动物和动物宿主密切关系的研究，已经为它们进化、可塑性，以及对它们存在的不同生态位（ecological niche）的适应提供了见解[1-2]。媒介和动物宿主中的新种及引起人类疾病的新种已经被描述[3-5]。

这些微生物的复杂基因组结构使它们能够通过其表面表达不同的抗原来适应不同的环境。这些抗原中的一些已与其毒力、侵袭及逃避宿主免疫系统的攻击有关[6]。

疏螺旋体属的成员是回归热组疏螺旋体引起的回归热和莱姆病（在此指莱姆疏螺旋体病）的病原体，后者是欧洲和美国最常见的媒介传播疾病，由一组被称为莱姆疏螺旋体（*Borrelia burgdorferi sensu lato*）的基因相关种引起[7-9]。虽然在南半球的节肢动物媒介中已经发现了莱姆疏螺旋体种，但莱姆疏螺旋体病仅在北半球有描述。这些节肢动物传播疾病存在的重要方面是存在合适的宿主、活性载体和易感并成为终宿主的人类宿主。如果这些因素不一致，人类的疾病发展就不会发生。

一、分类

疏螺旋体属归为螺旋体目（order *Spirochaetales*），螺旋体目包括螺旋体科（*Spirochaetaceae*）和钩端螺旋体科（*Leptospiraceae*）。螺旋体科包括疏螺旋体属和密螺旋体属（*Treponema*）。疏螺旋体属是媒介传播，并通过人畜共患源引起人类疾病，而引起梅毒的梅毒螺旋体则是从感染的人体中获得[10]。在对螺旋体目成员高度保守的蛋白进行序列分析的基础上，提议将疏螺旋体属提升至疏螺旋体科。这是由于独特保守特征性插入和缺失的存在，其可清楚地将疏螺旋体种从螺旋体科的其他成员中区分出来[11]。此外，一个提议是将疏螺旋体属划分为 2 个属，并命名一个新的疏螺旋体属以包括莱姆疏螺旋体种[12]，但这个提议存在争议[13-14]。该提议是基于回归热和莱姆疏螺旋体组之间的基因组、遗传和表型特征差异。由于未完全接受此更改，因此我们将疏螺旋体属作为这两个组的属名称。

最近的分类学研究已使用多位点序列分析法，对染色体管家基因和其他存在于疏螺旋体属独特基因组中的基因进行了分析。这些方法取代了过去用来定义新种的常规 DNA-DNA 杂交研究[1，5]。

尽管系统发育研究确定，在疏螺旋体属中存在两个谱系，即回归热和莱姆疏螺旋体病组，但是这些组之间存在大量的遗传同源性。2 组之间存在保守的染色体和质粒序列。例如，赫氏疏螺旋体（*B. hermsii*）和特里蜱疏螺旋体（*B. turicatae*）的线性质粒（lp）174 和 lp150 的 DNA 序列分别与莱姆疏螺旋体的 lp54 的序列同系[15]。

许多疏螺旋体属菌株的全基因组测序已有助于进一步定义该属中的种。莱姆疏螺旋体复合体中有 20 多个基因种，同样有 20 多个回归热疏螺旋体种（表61-1）。在美国和欧洲，莱姆疏螺旋体的

*注：本章包含 Martin E. Schriefer 在本手册第 11 版第 59 章中呈现的部分内容

表 61-1 筛选出的引起人类疾病的疏螺旋体种[a]

疾病	疏螺旋体属和种	传播媒介	动物宿主	地理分布
回归热	回归热疏螺旋体			
	高加索疏螺旋体	*Ornithodoros verrucosus*	啮齿动物	高加索
	麝疏螺旋体	*Ornithodoros sonrai*	啮齿动物	非洲、近东、中亚
	达顿疏螺旋体	毛白钝缘蜱	人	非洲
	赫氏疏螺旋体	赫姆斯钝缘蜱	啮齿动物	美国西部和加拿大
	西班牙疏螺旋体	犬恶钝缘蜱	啮齿动物	西班牙、葡萄牙、摩洛哥、阿尔及利亚、突尼斯
	马氏疏螺旋体	塔拉钝圆蜱	啮齿动物	美国南部、墨西哥、中美洲和南美洲
	扁虱疏螺旋体	扁虱钝缘蜱	啮齿动物	美国西部
	波斯疏螺旋体	*Ornithodoros tholozani*	啮齿动物	中东、中亚
	回归热疏螺旋体	人虱及其亚种	人	东非以至全世界
	特里蜱疏螺旋体	墨西哥阿瓜斯卡连特斯钝缘蜱	啮齿动物	美国西南部
	委内瑞拉疏螺旋体	*Ornithodoros rudis*	啮齿动物	中美洲、南美洲
硬蜱传播的回归热	宫本疏螺旋体	全沟硬蜱、肩突硬蜱、蓖子硬蜱	啮齿动物	日本、美国、瑞典
莱姆疏螺旋体病	莱姆疏螺旋体			
	阿氏疏螺旋体	蓖子硬蜱、全沟硬蜱	啮齿动物	欧洲、亚洲
	巴伐利亚疏螺旋体	蓖子硬蜱、全沟硬蜱	啮齿动物	欧洲、亚洲
	比氏疏螺旋体	太平洋硬蜱、*Ixodes spinipalpis*、肩突硬蜱	啮齿动物、鸟类	美国、欧洲
	伯氏疏螺旋体	肩突硬蜱、太平洋硬蜱、蓖子硬蜱	啮齿动物、鸟类	美国、欧洲
	加林疏螺旋体	蓖子硬蜱、全沟硬蜱	啮齿动物	欧洲、亚洲
	葡萄牙疏螺旋体	蓖子硬蜱	啮齿动物、蜥蜴	中欧
	宫本疏螺旋体	肩突硬蜱	啮齿动物	美国中西部
	斯皮尔曼疏螺旋体	蓖子硬蜱	啮齿动物	欧洲
	瓦莱疏螺旋体	蓖子硬蜱、*Ixodes nipponensis*、*Ixodes columnae*	啮齿动物、鸟类	欧洲、亚洲

注：[a] 经授权改编自参考文献[151]

3 个基因种，狭义的莱姆疏螺旋体[(*B. burgdorferi sensu stricto*)，本章中称莱姆疏螺旋体(*B. burgdorferi*)]、阿氏疏螺旋体(*B. afzelii*)和加林疏螺旋体(*B. garinii*)是最常见的引起莱姆疏螺旋体病的种[16-17]。也已发现可引起人类疾病的莱姆疏螺旋体复合体的其他基因种是巴伐利亚疏螺旋体(*B. bavariensis*)、比氏疏螺旋体(*B. bissettiae*)、葡萄牙疏螺旋体(*B. lusitaniae*)、斯皮尔曼疏螺旋体(*B. spielmanii*)、瓦莱疏螺旋体(*B. valaisiana*)和最近的梅奥疏螺旋体(*B. mayonii*)[18-21]。

回归热疏螺旋体组涵盖了通过不同节肢动物媒介传播的种，但主要是通过纯绿蜱属(*Ornithodoros*)的软蜱传播。与莱姆疏螺旋体病疏螺旋体相反，回归热疏螺旋体种有更广泛的地理分布，在两个半球均引起疾病(表 61-1)。

二、属的描述

疏螺旋体属为螺旋形，直径为 0.2～0.3 μm，长度为 3～18 μm。与钩端螺旋体不同，它们没有钩端。至于螺旋体目的所有其他成员，它们具有周质内鞭毛，在细胞的中央区域重叠，并为细菌提供穿过组织所需特征性的螺旋和摆动运动。这些内鞭毛位于外膜下方，插入原生质柱的近末端。原生质柱由肽聚糖层和包绕细胞内部结构的内膜组成[22]。其肽聚糖的二氨基酸成分是左旋鸟氨酸。它们是宿主相关且微需氧菌，具有非常有限的代谢能力。大多数疏螺旋体代谢碳水化合物或氨基酸作为碳和能源。其 G+C 含量为 27～32 mol%[23]。

基因组

该属的独特特征之一是存在线性染色体、几种线性和环状质粒。编码适应和入侵载体或宿主所必需因子的许多基因都位于这些质粒上[23-26]。已对属于不同种的菌株进行了测序,以比较其抗原结构、进化和致病性。其染色体包含的基因主要编码管家功能,代谢能力非常有限。许多与节肢动物载体和脊椎动物宿主相互作用所需的功能由位于质粒上的基因编码。超过 100 个质粒起源基因和 50 个染色体起源基因与其脂蛋白的产生有关。这些脂蛋白位于细胞表面,使细菌能够适应环境变化并逃避宿主免疫系统的识别和攻击。现在已经对许多疏螺旋体某种基因组进行了测序,但主要是莱姆疏螺旋体种菌株的基因组。在所有测序的菌株中,伯氏疏螺旋体(B31 株)是拥有最大的基因组数量大小之一的疏螺旋体种[1,519,132 个碱基对(bp)],具有 910 kbp 的染色体和 12 个线性质粒和 9 个环状质粒,总计 609 kbp。这是所有细菌种中所报道的最大质粒数量的菌种。回归热疏螺旋体(*B. recurrentis*)(A1 株)具有 1.2Mbp 的基因组,具有 930kbp 的染色体,只有七个线性质粒包含 311kbp。流行于西非的蜱传回归热(tick-borne relapsing fever, TBRF)疏螺旋体达顿疏螺旋体(*B. duttonii*)(Ly 株),具有更大的 1.5 Mbp 的基因组,931 kbp 的染色体和包含 643 kbp 的 16 个质粒(15 个线性和 1 个环形)[27]。比较这两个回归热疏螺旋体菌株的基因组,发现它们的染色体是共线的,尽管回归热疏螺旋体质粒数量有所减少,但所有质粒在达顿疏螺旋体中都有一个对应物。据推测,由于基因组的相似性,回归热疏螺旋体属于达顿疏螺旋体中的一种,前者中的遗传物质丢失可能与其毒力增加有关[27]。

到目前为止,除了在染色体右端有类似质粒序列之外,已测序的不同莱姆疏螺旋体种之间的染色体序列具有很高的同源性。但是,每个种间质粒的数目及编码的遗传特征方面具有更高的可变性。在已经测序的所有莱姆疏螺旋体种中都发现了以下质粒:lp54、cp26 和 cp32。在这些质粒中,许多对莱姆疏螺旋体与节肢动物载体的相互作用及其对动物宿主的毒性起到至关重要的作用[28]。lp54 编码在蜱环境中很重要的外膜蛋白(Osp)A 和 B,以及与宿主相互作用中很重要的核心蛋白多糖结合蛋白(Dbp)A 和 B[24,26]。在蜱吸食期间上调的 OspC 在 cp26 上编码。对来自不同菌株的 OspC 序列的分析表明,基因交换对于抗原多样性和免疫逃逸可能很重要[29]。质粒分析表明,其包含假基因和进化衰退基因,有些具有噬菌体样序列,该序列可以导致重组和 DNA 重排[24,26]。质粒 lp28-1 在主要变化蛋白样序列(*vls*)基因座中包含一组连续的 15 个沉默基因盒,其序列可通过基因或区段基因转化而移动到位于同一质粒上的表达位点 *vlsE*。这使得病原体宿主相互作用所需的 VlsE(表达的主要可变蛋白样序列)的外膜脂蛋白具有多样性[30]。

赫氏疏螺旋体和特里蜱疏螺旋体的线性质粒包含编码外膜脂蛋白的基因,该外膜脂蛋白称为主要变化蛋白(variable major proteins, Vmps)。如在莱姆疏螺旋体病疏螺旋体中,这些基因是沉默的,而当其移位到线性质粒端粒附近时才立即启动表达,如之前对 VlsE 所述。

三、种

(一)回归热疏螺旋体组

目前该组中有 20 多个种(表 61-1)。在北美,引起疾病最常见的种是蜱传螺旋体,即赫氏疏螺旋体、特里蜱疏螺旋体、扁虱螺旋体(*B. parkeri*),它们分别从赫姆斯钝缘蜱(*Ornithodoros hermsi*)、墨西哥阿瓜斯卡连特斯钝缘蜱(*Ornithodoros turicata*)、扁虱钝缘蜱(*Ornithodoros parkeri ticks*)中分离出来。这些及其他回归热疏螺旋体的种状况可能会由于高度的 DNA 同源性而改变[31]。最近的基因组序列分析也增加了回归热疏螺旋体、达顿疏螺旋体和田鼠疏螺旋体(*B. microti*)属于同一个菌种的可能性[27]。回归热疏螺旋体流行于非洲,那里最常见的种是北部的西班牙疏螺旋体(*B. hispanica*)、西部的麝疏螺旋体和东部非洲的达顿疏螺旋体[32]。

在 20 世纪 90 年代中期,一种新的回归热疏螺旋体宫本疏螺旋体(*B. miyamotoi*)从日本的全沟硬蜱(*Ixodes persulcatus*)中首次分离出来。从那时起发现,其在俄罗斯和随后在北美会引起人

类疾病，分别由蓖子硬蜱（*I. ricinus*）和肩突硬蜱（*I. scapularis*）传播，这些都存在于蓖子硬蜱复合体中[3-4,33]。

在过去10年中，已描述的其他回归热疏螺旋体种还包括已在北美硬蜱（*Amblyomma americanum*）中发现的孤星蜱疏螺旋体（*Borrelia lonestari*）。尽管最初认为其为一种名为STARI（南部蜱相关皮疹疾病）皮肤感染的病原体，但其病因学作用尚未得到证实[34-35]。其他的回归热疏螺旋体包括来自扁虱钝缘蜱和坦桑尼亚患者的布鲁疏螺旋体，以及来自伊朗犬恶钝缘蜱（*O. erraticus*）的田鼠疏螺旋体[36]。

毫无疑问，引起流行回归热最多的疏螺旋体菌种是由人虱（*Pediculus humanus*）传播的虱传回归热（louse-borne relapsing fever，LBRF）的回归热疏螺旋体[37]。尽管个人卫生和卫生条件已得到改善，导致虱传降低，但在世界贫困地区以及从这些地区个体移民所至的地区仍然存在案例报道[38-39]。

（二）莱姆疏螺旋体（莱姆疏螺旋体组）

已有20多个莱姆疏螺旋体基因型的描述。其中，伯氏疏螺旋体（在此指*B. burgdorferi*）、加林疏螺旋体、阿氏疏螺旋体、巴伐利亚疏螺旋体、斯皮尔曼疏螺旋体、比氏疏螺旋体、瓦来疏螺旋体（*B. valaisiana*）和最近发现的引起人类疾病的梅奥疏螺旋体[18,40]。所有这些，除已在欧亚大陆发现的梅奥疏螺旋体外，在北美仅发现伯氏疏螺旋体、比氏疏螺旋体和梅奥疏螺旋体已引起人类感染[5-20]。尽管该组疏螺旋体的成员有许多共有特征，但它们引起疾病的能力和所产生的表现各不相同。因为它们专性寄生，所以使其生物学特征与节肢动物媒介和它们所寄生的动物宿主库密切相关。重要的外膜抗原如OspC和VlsE在质粒中编码[6]。这些抗原在莱姆疏螺旋体逃避宿主免疫系统中发挥了很重要的作用，其表达与环境刺激有关。OspC在感染早期阶段上调，一旦感染确立则下调。

本组疏螺旋体（除梅奥疏螺旋体外）没有引起可达到检测水平的螺旋体病，正如回归热疏螺旋体所发现的，该菌的临床表现与其组织定位及其引起的免疫反应有关。

四、流行病学和传播

（一）回归热疏螺旋体组

回归热疏螺旋体存在于全球许多不同的地理区域。其主要由软体的纯绿蜱属（*Argasidae*，软壳）传播[32]。该蜱在夜间叮咬并且快速进食，它们不会长时间依附于宿主[38,41]。一旦纯绿蜱属蜱被感染后终身均具传染性，且由于该组螺旋体经卵传播，故后代会受到感染。此外，回归热疏螺旋体存在于蜱唾液腺中，因此蜱叮咬宿主后传播可以很快发生。在美国西部，此类疾病典型发生在高海拔森林地区且常由赫氏疏螺旋体引起[41]。宿主包括野生啮齿动物，特别是花栗鼠（*Tamias* spp.）和松鼠（*Tamiasciurus* spp.）。人类多由于在啮齿类动物宿主和传播媒介存在的自然疫源区野营而受到感染。蜱传回归热在美国西部12个州均有报道，大多数报道的病例来自加利福尼亚州、华盛顿州和科罗拉多州。1990—2011年间共计504例病例被报道，病例数目的中位数约为20例/年[42]。1973年在亚利桑那州暴发了最大的疫情，大峡谷附近有62例患者的病例报告。最近暴发的疫情发生于2014年亚利桑那州一支高中足球队，队员在为即将举行的青年露营活动清洗和翻新木屋时被感染，其中有6例确诊，5例疑似病例报道。在确诊的病例及2只花栗鼠中经培养及PCR检测均发现了赫氏疏螺旋体[43]。从营地也排查出赫姆斯钝缘蜱，但赫氏疏螺旋体并未检测到阳性。在本次调查中发现，在正常栖息地即宿主巢穴附近并未见到蜱，在露营者就寝区附近的窗台表面却可以见到[44]。

欧亚大陆的蜱传回归热主要由波斯疏螺旋体（*B. persica*）引起，但其他疏螺旋体菌种也已有描述。左氏钝缘蜱是欧亚大陆蜱传回归热最重要的蜱虫载体，可于印度、克什米尔、苏联南部国家、伊朗、伊拉克、叙利亚、约旦、土耳其、以色列、埃及和塞浦路斯等国家发现。在以犬恶钝缘蜱分布为主的地中海地区，大多数病例由西班牙疏螺旋体引起[32]。

虽然大多数回归热疏螺旋体均经软蜱传播，但一些种则通过硬蜱传播。它们是由硬蜱属某种传播的宫本疏螺旋体和由埃及璃眼蜱（*Hyalomma aegyptium*）传播的特里蜱疏螺旋体。在硬蜱

属中宫本疏螺旋体的携带情况在美国各不相同；而东北部的肩突硬蜱中，与宫本疏螺旋体相比，伯氏疏螺旋体占主导地位；而在西海岸的太平洋硬蜱(*I. pacifcus*)中，宫本疏螺旋体感染则更多。尽管宫本疏螺旋体和伯氏疏螺旋体共享相同的动物宿主，但前者可能由于在蜱载体中经卵传播，而出现在肩突硬蜱的幼虫中[33]。

回归热疏螺旋体由人体虱人虱传播。其曾在世界范围内流行，是流行病的病因，最近主要流行于非洲撒哈拉以南区域，特别是坦桑尼亚、埃塞俄比亚和苏丹等贫困和拥挤的生活环境的地方。然而，最近在欧洲的非洲难民中已观察到了虱传回归热，且其在局部地区的传播已经被报道。2015年，在欧盟的不同国家的非洲难民中共报道了28例感染病例，其中大多数病例是来自德国的报道[39,45]。由于当前的难民危机使来自疫区成千上万的人抵达欧洲，并且他们生活状况堪忧，导致虱传回归热病例增多。在法国马赛对930名无家可归者进行的一项为期4年的研究发现，与对照组结果0/467相比，15/930(1.6%)的难民检测到回归热疏螺旋体抗体[46]。

(二)莱姆疏螺旋体(莱姆疏螺旋体组)

莱姆疏螺旋体菌种引起莱姆病，该病在北半球是最常见的媒介传播疾病[40,47]。据估计，在美国每年发生的莱姆病病例超过30万例[40]。记录显示，美国大多数病例来自东北地区、大西洋中部及上中西部各州[47]。在欧洲，莱姆病发病率范围从英国的0.7 / 100 000至斯洛文尼亚的300/100 000[48]。基于德国约8200万居民的人口总数，推断每年莱姆病病例数目约215 000例[49]。该比率最接近2016年奥地利的估算比率，即约800万人中27 000例/年。

这些微生物通过蓖子硬蜱组中的蜱虫传播，并且大多数以啮齿动物作为动物宿主(表61-1)。加林疏螺旋体以鸟类为宿主[19]。肩突硬蜱是美国东北部和上中西部地区的媒介，而太平洋硬蜱是美国西部的媒介。欧洲的媒介为蓖子硬蜱，亚洲的媒介为全沟硬蜱。

蓖子硬蜱的复合蜱通常有2年寿命，分为3个以血液为食的周期，即幼虫、若虫和成年雌虫期。幼虫喜吸食小型哺乳动物和鸟类的血液，而若虫和成虫更喜以大型哺乳动物包括人类的血液为食。每次捕食，蜱虫都可以从动物宿主感染莱姆疏螺旋体[40]。在莱姆病肆虐的大部分欧盟地区，蓖子硬蜱的平均感染率为10%～30%[50-52]。与回归热疏螺旋体有文献记载不同，蓖子硬蜱是否可经卵传播病原体尚未被确证。莱姆疏螺旋体菌种定植于被感染蜱虫的中肠内，病原体对易感人群的有效传播有赖于蜱虫超过24～48 h的长时间叮咬。因此迅速去除附着的蜱虫是预防莱姆病的有效方法[41]。在美国东北部、大西洋中部和中西部，伯氏疏螺旋体是引起莱姆病的最常见菌种。与比氏疏螺旋体相关的几个病例已在美国东南部和西海岸地区被描述[20]。2016年在美国中西部地区发现伯氏疏螺旋体组的一个新种。由于其鉴定过程在梅奥诊所完成，研究人员将其命名为梅奥疏螺旋体，目前其仅见于美国上中西部地区。该种也可经肩突硬蜱传播，动物宿主也包括啮齿动物。与可引起莱姆疏螺旋体病的其他疏螺旋体种所见相反，疏螺旋体血症可达到显微镜检水平[5]。

欧洲和亚洲的莱姆疏螺旋体病是由莱姆疏螺旋体基因种引起，该基因种的异质性[53-54]比在美国引起疾病的病原菌更高。在欧洲的原始研究发现，其差异之大足以定义至少8种OspA血清型[55]，这与遗传菌种分类密切相关。OspA血清型1对应于伯氏疏螺旋体，OspA血清型2对应于阿氏疏螺旋体，OspA血清型4对应于巴伐利亚疏螺旋体，OspA血清型3和5～8对应于加林疏螺旋体。这些欧盟的血清型可发现于不同的地理区域，并且与不同的临床表现相关。阿氏疏螺旋体/OspA血清型2主要从皮肤中分离或检测出，而加林疏螺旋体和巴伐利亚疏螺旋体则从脑脊液检出。

五、临床意义

(一)回归热疏螺旋体组

由回归热疏螺旋体引起的回归热是与高热反复发作相关的复发性螺旋体血症。螺旋体血症复发和相关的临床发现与疏螺旋体Vmp抗体的进展有关，该抗体导致循环中微生物的下降。当疏螺旋体改变其Vmp膜抗原的表达时，它们可以逃避新生成抗体的作用，并伴有菌血症反弹[32,41-42]。此过程可能会发生几次，从而导致复发性表现。

除发热外，患者还会出现头痛、肌痛和关节痛。一种常见的实验室异常是血小板减少症。虱传回归热可表现为出血倾向，并且具有比蜱传回归热更高的致死率，蜱传回归热的估计病死率为2%～5%[37,56]。由于回归热疏螺旋体在非洲流行地区与其他病原体共存，因此合并感染的发生可能性应该会比文献记载的频率更高。在塞内加尔的患者中已经报告了由恶性疟原虫引起的疟疾和由麝疏螺旋体引起的回归热[57]。

宫本疏螺旋体可导致免疫功能低下个体的脑膜脑炎。在美国和欧亚大陆，感染宫本疏螺旋体的患者在临床表现上的差异似乎表明，它们可能与来自这些地理区域的菌株之间的遗传和抗原差异有关[3]。在亚洲发现的那些菌株已被提议命名为 *B. miyamotoi sensu stricto*，而在北美的那些菌株则被提议命名为 *B. miyamotoi sensu lato*[25]。

在美国南部的患者中，已经描述了一种称为 STARI 的皮肤病变，有时与移行性红斑（erythema migrans，EM）混淆。这种皮疹与美洲钝眼蜱（*A. americanum*）的叮咬有关，如果有感染病因，目前尚不清楚。曾经被认为是由孤星蜱疏螺旋体引起的，目前尚存在争议[34-35]。

（二）莱姆疏螺旋体（莱姆疏螺旋体组）

虽然美国的伯氏疏螺旋体在早期感染中最常引起移行性红斑，以及晚期表现为关节炎，但仍然有其他重要的种特异性的临床表现或关联。在欧洲最常见莱姆疏螺旋体病的病因是阿氏疏螺旋体，其早期导致移行性红斑，晚期表现为慢性萎缩性肢端皮炎（acrodermatitis chronica atrophicans，ACA）[16-17]（表 61-2）。加林疏螺旋体的原始描述将该种与莱姆神经疏螺旋体病相关；进一步的分子分析表明，有 OspA 4 型的该种的一组，属于一个新的种，即巴伐利亚疏螺旋体，该种通常与神经疏螺旋体病有关。这个新种以啮齿动物为宿主。有趣的是，虽然伯氏疏螺旋体感染在欧洲罕见，但其与莱姆神经疏螺旋体病的相关性比在美国更密切；其亦比阿氏疏螺旋体更易引起播散性疾病。据推测，这种差异可能与人类宿主、蜱媒或细菌因子相关[58]。一些感染被忽视，可能是轻度或无症状的。有规律蜱虫暴露的个体，如猎人，经常有显著增加的抗体滴度[59]，但很少有临床莱姆疏螺旋体病的病史。

表 61-2 莱姆病的临床表现和推荐的实验室检测[a]

疾病	临床表现	实验室检测	评论
早期疾病			
移行性红斑（EM）	蜱虫叮咬后 1～4 周内出现的叮咬处直径至少 5cm 的红斑性皮损扩大。伴或不伴有发热、不适、关节痛、头痛 诊断是临床的	EM 皮肤损伤的 PCR 和培养（仅与研究领域相关并在研究领域中表现最佳） 两步法检测抗体；如果在急性期和恢复期进行，效果会更好	诊断依据临床表现（在适当的流行病学环境中） 如果 EM 不典型，可能需要实验室检测
疏螺旋体淋巴瘤	无痛的红蓝色结节或在耳垂或乳头上的斑	与 EM 一样	罕见的表现；几乎只在欧洲出现
早期播散性			
多发性 EM	几种扩大的 EM 损伤分布在皮肤的不同部位；发热、头痛、肌痛	为早期播散性疾病的所有表现而进行两步法检测抗体	
莱姆神经疏螺旋体病	脑膜炎、脑神经麻痹、脑膜炎-神经炎	脑脊液细胞学分析（淋巴-血浆细胞胸膜病），总 IgG、IgM，鞘内产生的抗莱姆疏螺旋体病的 IgG 抗体 CXCL13 检测	莱姆神经疏螺旋体病最常见于欧洲
心肌炎	传导缺陷、房室传导阻滞		CXCL13 的检测仅在没有细胞增多的早期疾病、抗生素治疗前和非常高浓度（pg/ml）时具有诊断支持作用

（续 表）

疾病	临床表现	实验室检测	评论
晚期疾病关节炎	1个或多个大关节反复发作或持续肿胀	关节液或滑膜液（研究领域）的PCR两步法检测抗体	关节炎在美国更为常见
慢性萎缩性肢端皮炎（ACA）	四肢伸肌表面长期呈蓝色或红蓝色病变，最终进展成萎缩性病变	组织学、PCR和培养（在研究领域中）	罕见的表现；几乎只在欧洲出现
晚期莱姆神经疏螺旋体病	单相缓慢进行性脑脊髓炎	脑脊液细胞学分析、总IgG、IgM、鞘内产生的抗莱姆疏螺旋体病的IgG抗体	罕见的晚期表现；欧洲常见

注：ª 经授权改编自文献[17]

EM通常代表接种部位的早期感染，是最常见的感染表现，在美国和欧洲约80%的患者中出现。其表现为被蜱虫叮咬后约1周，在蜱虫附着部位出现一个扩大的红斑病变[16-17]。因为它发生在被蜱虫叮咬后不久，所以EM主要在春季和夏季被观察到。早期伴EM莱姆疏螺旋体病的诊断依赖临床，并且依赖于地方性区域暴露于硬蜱属而受到的叮咬个体特征性皮损的存在。EM通常单发，但可能伴有发热、疲劳、头痛、轻度颈部僵硬、关节痛或肌痛。欧洲的早期莱姆疏螺旋体病表现的EM，常不伴随在美国的感染者有时观察到的全身症状[18,48]。

如果不加治疗，这种感染可以通过血源性传播而扩散，导致在初发EM的几天或几周内出现可以早期传播的感染。这些包括在其他皮肤部位的感染，伴有多个EM病变、神经临床表现（脑膜炎、颅神经麻痹）[60]，或心脏受累（心肌炎、房室传导阻滞）[16-17]。伯氏疏螺旋体的传播与其特异性抗原和分子特征相关[61]。在欧洲，多发性EM更多见于儿童[62-63]。

早期莱姆疏螺旋体病的临床表现随地理位置和感染微生物而异。在欧洲发生的由阿氏疏螺旋体感染引起的皮肤临床表现是疏螺旋体淋巴瘤，这是淋巴细胞和浆细胞对疏螺旋体感染引起的皮肤渗透反应，表现为青肿。成人淋巴瘤78%发生在乳头，其次是耳垂，占19%，其他皮肤部位发生概率较低[64]。欧洲的莱姆神经疏螺旋体病发生率占所有莱姆疏螺旋体病患者的5% ~10%。轻微的脑膜炎和面部麻痹多见于儿童，但疼痛性的脑膜神经根炎，也称为Garin-Bujadoux-Bannwarth综合征，是成人莱姆疏螺旋体病主要的神经系统表现。但这种表现在北美并不常见[16-17]。

莱姆病的晚期并发症在美国和欧洲也有所不同。在美国，最常见的临床表现是间歇性或持续性的单关节或少关节炎，关节炎在感染后几个月到几年内进展[16]。关节炎也发生于欧洲患者；然而，关节炎通常可以自发缓解，过渡为慢性表现则相当罕见[65]。

ACA是欧洲莱姆疏螺旋体病常见的晚期表现。与EM和疏螺旋体淋巴瘤相比，ACA不能自行愈合。ACA患者经过较长潜伏期（数月至数年）后出现初始浸润期，随后出现特征性皮肤萎缩性改变，表现为皱褶状，如皱缩的薄纸，呈灰白色并伴有静脉突出。ACA通常开始于身体一侧，常常是四肢的扩展侧，但随着时间的推移可能变得对称[17]。

罕见的是，晚期莱姆疏螺旋体病可能引起神经系统症状，如脑病或脑脊髓炎。莱姆脑病现在很少遇到；它最初见于长期患关节炎的莱姆病患者中。具体包括记忆、认知和智力功能障碍[66]。这些表现并不是莱姆病特有的，可能与炎症或其他感染性疾病有关[60]。

欧洲的慢性莱姆神经疏螺旋体病是一种罕见情况，大约占所有莱姆神经疏螺旋体病患者的1%。它被定义为连续和明显的脑脊液炎症，且超过6个月以上的持续活动性疾病。患者在抗生素治疗下显著恢复；然而，由于此前实质损伤引起的后遗症可能持续存在。它不应该与称为莱姆脑病或“慢性莱姆”或后莱姆综合征的情况相混淆[67]。

周围神经病变也可能发生，伴随着慢性斧状神经病变导致疼痛和感觉异常。在大约40%的ACA患者中，可观察到不对称的斧状多神经病变。这是在欧洲可见的外周神经病变与莱姆疏螺旋体病的唯一关联[17]。

虽然采用常规抗生素疗法，但是病原体仍然

存在，然而“慢性”莱姆疏螺旋体病的存在，却不能被广泛微生物学、双盲、安慰剂对照的临床研究所支持[68-69]。这种诊断已被用来解释一些非特异性症状，如肌痛、关节痛和注意力不集中等，在这些个体中，没有关于伯氏疏螺旋体正在感染的客观证据[70]。

2016 年在美国中西部患者中描述的梅奥疏螺旋体，其临床表现与其他莱姆疏螺旋体病组的成员不同。在最初描述的 6 个病例中，大多数表现为发热性疾病和皮疹。最为显著的是定量 PCR 检测结果表明外周血涂片中可检测到螺旋体的存在，而此现象在由莱姆疏螺旋体其他基因种所引起的莱姆疏螺旋体病中则不可见[5]。

六、实验室诊断

样品

1. 回归热疏螺旋体组 用 EDTA 采集血液制备的外周血液涂片中可以检测到回归热疏螺旋体。该样品也可使用 PCR 技术和培养。偶尔其他样品，如脑脊液，在宫本疏螺旋体感染的脑膜脑炎情况下是有用的。

在疏螺旋体血清学的急性期和恢复期，也应收集用于血清制备的血液。

2. 莱姆疏螺旋体(莱姆疏螺旋体组) 对于疏螺旋体的培养和核酸检测，在无菌条件下收集和制备标本至关重要。体液运输时不应添加任何添加剂，活检标本应置于少量的无菌盐水中，即一滴，或适当的培养基中(见下文“培养”)。样品应尽可能快地送达实验室，理想情况下在 2～4 h 内。在临床实验室中很少进行培养，但是在某些公共卫生和研究实验室中可以进行培养。

EM 损伤的皮肤活检可用于进行培养或如 PCR 等的核酸扩增试验(nucleic acid amplification test，NAAT)。这些方法大多已用于研究领域中，因为在此阶段不需要进行实验室测试即可确定诊断[71]。来自 ACA 的皮肤样品可能也可用于专业实验室的直接检测方法；培养和 PCR 的敏感性约为 30%[72]。

EDTA 采集的全血可用于疾病早期播散期的细菌培养或 PCR 检测。至于标准的细菌血液培养方法，大量的血液(9 ml 血浆)已经被用于更有效地分离培养中的莱姆疏螺旋体[73]。最近有报道称，在培养中，柠檬酸盐抗凝血剂收集的血液可能比 EDTA 更能复苏培养中的伯氏疏螺旋体[74]。血清应在急性期和恢复期收集并且应在 2 周内分离，以检测血清中诊断性抗体的存在，这是支持临床诊断的最常用方法[71]。

在有神经系统疾病的患者中，收集的脑脊液可能用于由培养或 PCR 法检测莱姆疏螺旋体，尽管这些检测的敏感性较低，如下所述。脑脊液和血清应同时收集，以检测脑脊液/血清抗体指数中表达的鞘内抗体的产生[71]。然而，尽管这种方法在欧洲使用较多，但在美国很少有实验室可提供这种方法。

滑膜液或组织用于检测怀疑患有莱姆关节炎的患者或监测治疗效果。这些样品可通过 PCR 检测，也可以通过培养(仅在研究领域中培养)进行检测。

七、方法

镜检

1. 回归热疏螺旋体组 大多数回归热疏螺旋体可在血液中高水平呈现，每毫升超过 10^6 个螺旋体。该特征使其能在瑞氏-吉姆萨染色的常规血涂片上检查到[41,75](图 61-1)。在感染宫本疏螺旋体罹患脑膜脑炎患者的脑脊液中，镜检也能够检测到螺旋体。

其他显微镜制备物的检测包括那些如用于疟

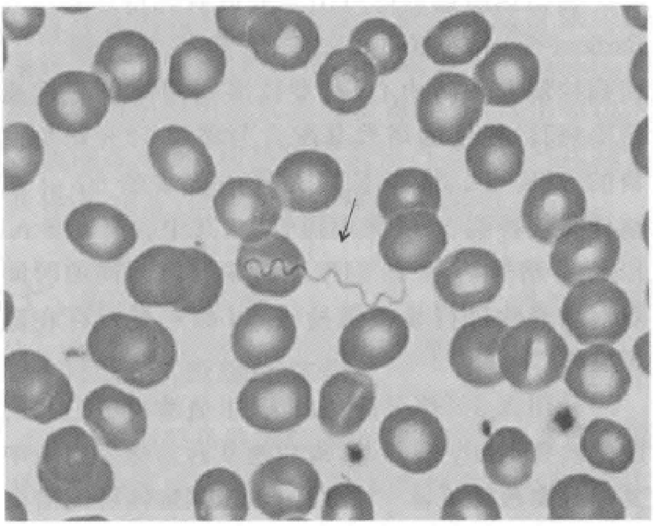


图 61-1 瑞氏-吉姆萨染色的外周血涂片，展示一个螺旋形的疏螺旋体菌属某种(箭头)。×100，见彩插

疾筛查的厚膜涂片、用暗视野显微镜检测活动螺旋体的湿涂片，以及通常用于检测疟原虫的血沉棕黄层定量分析法(quantitative buffy coat，QBC)的使用[76]。这些方法对常规血涂片检查的敏感性已预估为25%(检测螺旋体血症至少10^5/ml)，对厚膜涂片的敏感性预估为50%～70%(敏感性约为10^4个螺旋体/ml)，对QBC的敏感性更好，可检测的螺旋体约10^3/ml[76]。

2. 莱姆疏螺旋体(莱姆疏螺旋体组) 莱姆疏螺旋体病伴随EM可作为一种临床诊断。然而，除典型的EM[71]外，所有呈现临床表现的患者都需要感染的实验室证据(表61-2)。

显微镜检查可用来观察来自EM或ACA皮肤活检的莱姆疏螺旋体，该活检常用如银染色等的特殊染色[71,77]。然而，由于螺旋体密度低，这种方法很少被用于诊断。与其他莱姆疏螺旋体某种不同的是，梅奥疏螺旋体可在外周血涂片上被观察到。6例被诊断为梅奥疏螺旋体感染的患者中，有1例有显微镜下可检测到的螺旋体血症，约为8.5×10^4/ml；基于定量PCR，预估在显微镜检出范围内，所有病例的中位数为8.1×10^5微生物/ml。与12例血中伯氏疏螺旋体PCR阳性的患者相比，本研究中，本组螺旋体的中位数为4.5×10^3/ml[5]。

八、培养

(一)回归热疏螺旋体组

回归热疏螺旋体可由专业或研究型实验室在Barbour-Stoenner-Kelly(BSK)培养基中培养[75,78]。疾病控制和预防中心(科罗拉多州柯林斯堡病媒传染病科)使用的培养基配方为添加12%幼兔血清的BSK-Ⅱ。将在EDTA管中收集的50 μl血液样品接种到5 ml聚丙烯管中，其中含有4.5 ml BSK-Ⅱ培养基，并在34℃下孵育。在不同的时间点对培养物进行显微镜检查，以确定是否存在疏螺旋体[43]。

采用含5%热灭活兔血清、牛血清白蛋白和明胶的改良Kelly培养基，成功地从西非患者血液中复苏到麝疏螺旋体[76]。回归热疏螺旋体可能需要5～7天的孵育才能在培养中检测出来。一旦培养确认为阳性，培养的样品就可以进行NAAT和测序以鉴定到种[76]。

由于一些回归热疏螺旋体可能有较低水平的螺旋体血症，以及实验室确证所面临的挑战，因此动物接种已被用作一种替代方法。在这种方法中，将250 μl的患者血液腹腔注射到小鼠体内，并在不同时间间隔或动物排泄后进行显微镜检查[75,78]。虽然此方法没有广泛应用于诊断，但动物接种已被用于研究领域，并成功地用于在加利福尼亚的蜱传回归热螺旋体暴发的调查[78]。

(二)莱姆疏螺旋体(莱姆疏螺旋体组)

莱姆疏螺旋体可体外培养于液体BSK、改良Kelly-Pettenkofer(MKP)及在微需氧条件下的这些培养基[73,79-81]。莱姆疏螺旋体的最佳生长温度为30～34℃。莱姆疏螺旋体能够从40%～88%的EM患者皮肤活检样品中培养到[71,82]。从5%～70.8%的早期莱姆疏螺旋体病患者的全血、血清或血浆中也培养出了这种微生物[73,83]。通过培养那些与常规细菌血培养相似血容量的样本，可以提高早期疾病血培养的阳性率。平均而言，孵育2～3周后可以观察到阳性结果，但偶尔在培养4天后的暗视野中就能够观察到疏螺旋体，特别是在皮肤活检标本中。为了进行种间区分，已经使用了几种分子遗传方法[84-85]。血培养的一种改良方法是对9 ml血浆进行培养，并通过定量PCR定期检测培养液等分试样，从而使早期莱姆疏螺旋体病和EM患者的检出率更高。采用这种方法，伴有EM临床诊断的65例患者中的45例(70.8%)得到阳性结果[83]。伯氏疏螺旋体已很少从其他样品中分离出来。在斯洛文尼亚以临床或疑似诊断为莱姆神经疏螺旋体病的患者中，156例脑脊液样品中的5例(3.2%)培养出螺旋体[86]。一项欧盟的研究报告，从8例莱姆神经疏螺旋体病患儿的脑脊液中，有3例分离到莱姆疏螺旋体[87]。从滑液组织或液体中通过培养而复苏莱姆疏螺旋体的可能性极低。

九、核酸检测

(一)回归热疏螺旋体组

与显微镜检测相比，NAAT更灵敏，可用于种的鉴定。由于疏螺旋体在分子水平上高度相关，因此16S rRNA(*rrs*)基因序列的分析可能不能很

好地提供种间鉴别的依据[88]。例如，麝疏螺旋体和达顿螺旋体之间的 *rrs* 基因仅有一个核苷酸的差异[88]。其他可用于种的鉴定序列包括 *flaB* 和 16S-23S 核糖体 RNA 基因间隔基因，特别是用于多间隔序列分型（multispacer sequence typing）或多位点序列分型（multilocus sequence typing，MLST）的序列[88]。甘油磷酸二酯磷酸二酯酶（*glpQ*）基因是回归热疏螺旋体是独有的，已被用于 NAAT[25]。在此基因中有一个 4bp 的单核苷酸多态性，是麝疏螺旋体特有的[88]。

16S rRNA 基因的 NAAT 检测后，再进行 16S-23S 基因间隔基因的巢式 PCR 及对阳性样品的测序，在美国近期由赫氏疏螺旋体引起的暴发中，此项技术被用于检测患者样品和蜱的回归热疏螺旋体[43]。一项调查来自美国东北部感染宫本疏螺旋体的患者的研究中，采用了以 *glpQ* 为靶点的 PCR[4]。

利用多重 PCR 已经对在非洲发现的几种回归热疏螺旋体进行了数项研究检测，他们利用了在这些区域中最常见回归热螺旋体的基因靶点，如麝疏螺旋体、达顿疏螺旋体、回归热疏螺旋体和西班牙疏螺旋体[75,88]。

(二)莱姆疏螺旋体(莱姆疏螺旋体组)

PCR 的诊断价值取决于临床疾病阶段和样品类型，它们共同决定了微生物存在的浓度，以及所用的 PCR 方法[71]。目前，基于 PCR 的分子检测主要应用于研究领域和商业参考实验室。除了在如皮肤、血液、脑脊液或滑膜液或组织等临床样品中的直接检测外，PCR 也已用于硬蜱属中蜱传播病原体核酸的检测，并已用于莱姆疏螺旋体的培养确认[71,83]。

用于莱姆疏螺旋体 PCR 的引物包括那些针对 *flaB*、16S rRNA、23S rRNA、5S-23S rRNA 间隔区、p66、*recA*、*ospA* 和 *oppA*1 的基因序列[5,71]。后者基于杂交探针和熔融温度差特性已用于检测莱姆疏螺旋体的不同基因种。梅奥疏螺旋体就是用这种方法发现的，因为其熔融温度超出了莱姆疏螺旋体的预期温度[5]。

PCR 在皮肤损伤中检测莱姆疏螺旋体 DNA 的敏感性通常较高，伴有 EM 的患者阳性率的中位数为 69%，以及 ACA 患者的阳性率中位数为 76%[71]。一项欧盟的研究报告称，PCR 阳性率与 EM 大小或相关的全身症状（如头痛、疲劳等）有关[89]。一般来说，PCR 检测莱姆疏螺旋体病患者血液、血浆或血清样品中伯氏莱姆疏螺旋体 DNA 的敏感性较低（<20%），特别是出现在由于缺乏或低水平螺旋体血症而错过早期疾病阶段就诊患者的样品[71]。梅奥诊所实验室最近对 2012—2014 年提交的 9197 份样品进行了实时 PCR 检测的分析表明，该检测罕见起作用。根据他们的实验分析，3127 份血液样品中只有 13 份（0.4%）、1196 份滑膜液中有 81 份（6.7%）、4782 份脑脊液中只有 3 份（0.06%）经 PCR 检测呈阳性[5]。然而，因为参考实验室从未被选择的患者群体中接收样品，所以不能从进行的测试推断出敏感性。66 例临床诊断为 EM 患者的血浆样品经 PCR 检测阳性率为 44.6%[83]。来自欧洲的一项研究中，对表现为莱姆神经疏螺旋体病患者的血样，经 PCR 检测阳性率为 11.9%[86]。从 1.25ml EDTA 全血中提取疏螺旋体 DNA，随后等温扩增 7 个莱姆疏螺旋体靶基因，血浆 PCR 阳性率为 62%[90]。在欧洲具有莱姆神经疏螺旋体病明确特征并被确诊患者群体中，CSF PCR 的敏感性为 10.7%～19.4%[86,91]。CSF PCR 在美国疑似莱姆神经疏螺旋体病患者中的敏感性低于欧盟经验。在一项研究中，从符合莱姆脑膜炎标准的儿童中收集的 CSF 样品中，20 个中只有 1 个（5%）PCR 结果为阳性[92]。在精心挑选的病例中，已成功应用 PCR 来检测未治疗莱姆关节炎患者的关节液或组织。PCR 检测滑膜液标本中伯氏疏螺旋体的敏感性中位数为 78%，该法比培养法更敏感[71]。尽管在欧洲几乎没有数据鉴别滑膜或滑液中的莱姆疏螺旋体，但可用的有限数据表明，在 37 例病例中可识别出的致病性疏螺旋体，其中伯氏疏螺旋体占 54%，加林疏螺旋体占 27%，阿氏疏螺旋体占 16%，巴伐利亚疏螺旋体占3%[93-95]。

十、血清学试验

(一)回归热疏螺旋体组

由于回归热疏螺旋体可以通过上述方法在临床样品中直接检测，在急性复发性发热发作期间，血清学试验在急性感染诊断中的用途有限。这些检测主要应用在人群研究和由于新种引起的感染确认方面。

使用回归热螺旋体抗原的间接免疫荧光抗体(indirect immunofluorescent antibody, IFA)测定，已用于检测 IgG 抗体[46]。该方法缺乏特异性，需要其他特异性更好的抗体检测方法如免疫印迹法的进一步确证。

使用重组 GlpQ 抗原的酶免法(enzyme immunoassay,EIA)在诊断回归热中是有用的[4,96]。该抗原仅存于回归热疏螺旋体；因此，本实验对这组疏螺旋体具有特异性。在美国东北部，使用从宫本疏螺旋体 glpQ 中提取重组抗原的试剂盒，用于检测肩突硬蜱叮咬后伴发热表现的一组患者中该微生物的抗体。在 29 例确证病例中，25 例(86%)宫本疏螺旋体的病例对 GlpQ 重组抗原产生了抗体[97]。

回归热疏螺旋体感染患者可以在伯氏疏螺旋体 EIA 抗体法检测中产生反应[96-97]，包括 C6 抗体检测。然而，这些样品大多不符合用于检测伯氏疏螺旋体抗体的免疫印迹法标准(详见本章后面的内容)。诊断为 STARI 患者的血清已发现在 C6 肽 EIA 中呈阴性[98]。

在参考实验室与 CDC，免疫印迹法可以检测回归热疏螺旋体[96]。回归热疏螺旋体的反应性可以通过免疫印迹法确证，该法通过观察 IgG 和 IgM 对 GlpQ 和 22 kDa 抗原的反应。

(二)莱姆疏螺旋体(莱姆疏螺旋体组)

由于这些微生物在临床样品中的严格性和稀少性，血清样品中抗体的检测是实验室诊断莱姆疏螺旋体病的主要手段[71]。近年来，利用包括 VlsE 的重组抗原扩展谱，以及线性印迹(line blot)或多重检测等新技术，在血清学诊断方面取得了重大进展。

(三)抗原

莱姆疏螺旋体有几种可用于诊断检测的免疫显性抗原。这些决定因素在传播、免疫逃逸和宿主中抗体反应的引发中发挥作用[6](表 61-3)。大多数重要的膜暴露脂蛋白(Osps)在质粒中编码，但也有一些位于染色体中。免疫原性最强的抗原之一是染色体编码的鞭毛蛋白(FlaB,41kDa)。鞭毛蛋白与其他细菌的鞭毛抗原有很强的交叉反应[99]。蜱虫吸食获得血液后，OspC(23kDa)在微生物表面表达。OspC 可使莱姆疏螺旋体传播到蜱唾液腺，并在疾病早期上调。OspC 是早期疾病患者血清中最具免疫显性的抗原之一[100]。VlsE(约 35 kDa)是早期疾病的一种重要免疫显性抗原，主要在哺乳动物宿主中表达，而在培养的螺旋体中不表达[101-104]。VlsE 的抗原变异使莱姆疏螺旋体能够在其天然宿主中存活，从而促进蜱的高效捕获[6,103]。VlsE (C6)的一个不变且高度免疫原性区域已被合成并用于抗体检测[101,104]。Bmp A (39 kDa)是一种染色体编码的蛋白，在早期疾病中具有高度的免疫原性[105]。P66 是一种染色体编码的 66 kDa 蛋白，是一种与哺乳动物细胞受体相结合、执行黏附素功能的类孔蛋白[6]。其他质粒编码的膜抗原包括 OspA (31 kDa)、OspB (34 kDa)和 OspD (28 kDa)，每一种都参与了伯氏疏螺旋体与中肠上皮的黏附。核心蛋白多糖结合蛋白 A (DbpA,17 kDa)允许疏螺旋体与结缔组织相互作用。BBK32 (47 kDa)也是质粒编码，可以与纤连蛋白结合[106-107]。BBK32 与 OspE 及相关蛋白主要在体内表达[6]。

表 61-3 莱姆疏螺旋体的免疫显性抗原[a]

蛋白(分子量)	功能/局限性	交叉反应性	评价
p83/93/100 (83～100 kDa)	与原生质圆柱体(或鞭毛?)相关	低	染色体编码
p66 (66 kDa)	膜相关孔蛋白	低	染色体编码
p58 (58 kDa)	寡肽透性酶	低	染色体编码
BBK32 (47 kDa)	外膜蛋白结合纤连蛋白	低	质粒编码 在体内表达
p41, FlaB (41 kDa)	鞭毛蛋白亚基	较广泛	染色体编码 中心可变及侧翼保守基因

(续 表)

蛋白(分子量)	功能/局限性	交叉反应性	评价
p39, BmpA (39 kDa)	与层黏连蛋白结合的相关膜	低(偶尔存在于梅毒患者血清)	染色体编码 菌株多样性
VlsE (34~37 kDa)	外膜蛋白 在免疫逃逸中起重要作用	低	质粒编码 仅在体内表达
OspB (34 kDa)	在蜱定植中起重要作用的外膜蛋白	不明	质粒编码 菌株多样性 在某些种中不表达
OspA (31 kDa)	在蜱定植中起重要作用的外膜蛋白	低	质粒编码 菌株多样性 差异表达
p30 (30 kDa)	不明	低	可能和 OspA 弄错
p28 (28 kDa)	与蜱中肠附着	不明	质粒编码
OspC (21~24 kDa)	外膜蛋白 从蜱中肠到唾液腺的传播	低	质粒编码 差异表达
Osp17, DbpA (17 kDa)	外膜蛋白与核心蛋白多糖结合	低	质粒编码

注:ª 经授权改编自文献[119]

莱姆疏螺旋体复杂的抗原组成和这些抗原在不同条件和不同感染阶段的差异表达,使得血清学抗原制备物的选择具有相当的挑战性。莱姆疏螺旋体病血清诊断的第一个抗体检测试剂盒使用了高传代的伯氏疏螺旋体,该螺旋体已丢失了质粒编码的如 OspC 高免疫原性抗原[99]。目前的抗体检测使用低传代菌株,主要是美国的 B31 菌株,一些已经添加了重要的重组抗原。重组抗原和肽抗原已在美国和欧洲使用,并且改善了免疫测定的性能[108-116]。

(四)方法

几种方法已经用于检测莱姆疏螺旋体的抗体,包括 IFA,EIA(如 ELISA),化学发光免疫测定(chemiluminescence immunoassay,CLIA)和免疫印迹(immunoblot,IB)。目前的推荐是使用两步法检测,其中 IFA、ELISA 或 CLIA 为第一步,IB 是第二步,用于检测那些在第一步检测中呈反应性的样品[117]。虽然一些研究实验室使用内部开发的实验,但大多数临床检测都使用上市商业试剂盒。美国 FDA 已经批准了超过 80 项检测方法,其中大多数使用伯氏疏螺旋体 B31 菌株作为抗原来源[118]。在欧洲,没有证据支持在血清诊断试验中使用不同的疏螺旋体基因种。就全细胞裂解物进行 EIA 检测而言,在欧洲的筛选试验中使用单个基因种就足够了。阿氏疏螺旋体菌种 Pko 的敏感性达到最高[119]。然而,美国免疫印迹的解释标准(CDC)不适合在欧洲使用。

(五)间接免疫荧光抗体试验

IFA 使用固定在玻片上的培养的疏螺旋体。将血清标本稀释在可能含有吸收剂的制剂中,比如包括来自于 Reiter 密螺旋体或卵黄囊的物质,以阻断非特异性抗体的结合。异硫氰酸荧光素标记的抗人 IgG 或 IgM 加入后,通过荧光显微镜检测疏螺旋体特异性抗体的存在。对筛选稀释有反应性的标本进行连续稀释。通常,在有和没有先吸收的 IFA 中,抗体滴度≥64 和≥256,分别认为阳性[120]。这种试验的局限性包括需要荧光显微镜和有经验的工作人员,以及能够判读和解释荧光显微镜结果的能力。虽然 IFA 仍有上市商业试剂盒,但其在很大程度上已被 EIA 取代。

(六)酶免疫分析技术

莱姆疏螺旋体抗体检测最常用的方法是 ELISA(或其他 EIA)或 CLIA[118,121]。尽管使用了包括重组抗原在内的其他抗原制备物,但这些试剂盒中大多数使用了伯氏疏螺旋体菌株 B31 的全细胞裂解液作为抗原来源[116,118]。在美国开发的试剂盒中使用了伯氏疏螺旋体的其他菌株,在欧洲内部应用的或上市商业试剂盒中使用了各种莱

姆疏螺旋体(伯氏疏螺旋体、加林疏螺旋体和阿氏疏螺旋体)菌种[122]。检测伯氏疏螺旋体 IgM 和 IgG 抗体的 ELISA 试剂盒,通常包括一个低值阳性对照,用于评估患者样品的反应性。患者反应性(光密度,OD)除以低值阳性对照,进而计算指数。由检测制造商定义的特异指数值可用于确定阴性、模棱两可和阳性结果[118]。

15 年前引入的 EIA 使用合成肽,该合成肽将 VlsE(C6)的不变区域 6 作为抗原[123]。C6 试剂盒已通过 FDA 批准用于第一步检测[118]。作为第一步,其对全细胞 EIA 具有类似的敏感性;在一项包括 569 例莱姆病患者的研究中,C6 和一种全细胞 ELISA 的敏感性分别为 75%和 81.7%[124]。其作为第二步检测也表现良好,比标准的两步法具有更高的敏感性[125-126]。当单独使用时,在单步法检测中,C6 试剂盒在美国患者中比两步法有更高的敏感性[124]。其对欧盟患者的两步法具有相似的敏感性[127-128]。虽然它在美国被作为单步法检测,但其特异性略低于两步法,两者分别为 98.9%和 99.5%[124]。在 C6 试剂盒中,16.7%被确诊为宫本疏螺旋体感染的个体检测结果为阳性[97]。

最近,CDC 血清小组已评估了分别检测重组 DbpA 和 OspC 的 IgM 抗体和 VlsE、DbpA 和 OspC 的 IgG 抗体的上市商业试剂盒[116]。作为两步法的第一步,作者比较了独立的 IgG、IgM ELISA 与联合的 IgG/IgM ELISA 的性能,发现了相似的敏感性(分别为 83%和 85%)和特异性(分别为 88%和 88%)。本试剂盒的优点包括相应的 IB 作为第二步的选择,理论上减少了进行 IB 的数量[116]。在本研究中,进行印迹的数量减少了 27%[116]。目前,所有经第一步多价 EIA 检测呈反应性的样品,都被选择用于独立的 IgG 和 IgM 免疫印迹;在独立的 IgG 和 IgM 第一步 EIA 中,那些与给定免疫球蛋白呈反应性的样品,将选择相应的 IB 进行检测。

使用低传代莱姆疏螺旋体超声全细胞制备物进行的 ELISA,其敏感性取决于感染的持续时间。ELISA 对持续时间少于 1 周的 EM 患者急性期血清的敏感性一般小于 50%[129]。这种方法的敏感性在未治疗的 EM 患者第一周后增加。在具有全身体征和症状的 EM 患者和那些有多种 EM 表现的患者中,该法敏感性也很高[129]。对于客观证据表明有皮外介入的患者(如心脏炎或莱姆神经疏螺旋体病),敏感性较高。ELISA 在如关节炎等晚期疾病临床表现的[130-132]患者血清中,几乎无一例外地呈阳性。

与其他免疫测定方法相比,莱姆疏螺旋体 ELISA 具有优于其他免疫测定的优势,包括易于检测,与存在抗体数量相对相关的客观定量结果和自动化能力。莱姆疏螺旋体抗体检测的 ELISA,其局限性之一是缺乏标准化。在不同制造商使用的抗原组分试剂盒及特异性免疫球蛋白分类试剂盒之间,尤其是 IgM 抗体检测的试剂盒之间是存在差异的。差异也存在于相同试剂盒的不同批号之间。在欧洲,现在该检测方法有强制性认证(CE 标示)。然而,这只能提供最低限度的一致性,并不能全面保证质量。在多中心研究中,性能的综合表现还不需要认证。莱姆 ELISA 的另一个局限性是由于使用全细胞抗原制备物而缺乏特异性。ELISA 检测莱姆疏螺旋体抗体的特异性一般在 97%以下[124]。在这些试剂盒中,确诊的宫本疏螺旋体感染患者也会呈反应性;在参考实验室使用的一种 IgM EIA 中,90%的这些病例血清转阳,但只有 10%符合 IB 的两步法检测标准[4]。在美国东北部进行的血清反应性和血清流行率的研究,报告了类似的结果[97]。

(七)免疫印迹

伯氏疏螺旋体不同抗原组分的抗体检测,对了解该疾病不同阶段的免疫反应有很大的贡献[105,129,133]。传统上,伯氏疏螺旋体全细胞制备物按电泳分离为不同分子量的蛋白,然后将其转移到膜上以作抗原。IB 试剂盒的最新改进包括使用应用到膜上的纯化抗原。利用血清样品与膜条带的反应,检测不同抗原成分的 IgG 和 IgM 抗体。目前在美国很少有 FDA 批准的上市 IB 商品试剂盒(118 个)。其中一些具有密度测量读数的能力,可以对重要的条带评分。通过与用作强度对照的控制条带强度进行比较,评分条带可直观进行。这种方法容易产生主观解释,尤其是对 IgM IB 的过度解读。密度测量读数已经被用来解决这个问题,但这种方法与直观评分比较,显示出略低的敏感性[131]。

(八)两步法

在 1994 年的第二次莱姆病检测标准化会议

上，美国就 IB 用于莱姆疏螺旋体病血清学诊断的结果解释标准达成了共识[117]。这次会议的组织者之一是 CDC，提议的标准变成了"CDC 标准"。根据 CDC 标准，样品应首先由一种敏感的初筛试验 ELISA、CLIA 或 IFA 进行检测，以检测伯氏疏螺旋体的 IgG 和 IgM 抗体，反应性样品应使用独立的 IgG 和 IgM IB 进行检测。IgM IB 的阳性结果需要至少对三种抗原中的两种（条带）有反应性：23（OspC）、39 和 41 kDa。IgG IB 中的阳性结果需要 10 个抗原中的至少 5 个为反应性：18、23、28、30、39、41、45、58、66 和 93kDa 条带（图 61-2）。进一步推荐的是，仅在早期疾病最初 30 天内使用 IgM IB 检测，在该疾病的任何阶段使用 IgG IB 检测[117]。

两步法对患 EM 的早期疾病患者，有较低的敏感性，在急性期和康复期分别为 30%～48% 和 68%[129-132]（表 61-4）。这主要是因为第二步 IB 的敏感性低，因为几乎一半的来自早期疾病患者的样品，其通过第一步检测呈反应性，但不符合 IB 印迹标准。早期疾病有限的敏感性不应构成问题，因为推荐在此阶段的诊断应基于临床结果。然而，为了提高早期疾病血清学的敏感性，提议对两步法试验进行修正（下面将讨论）。在早期播散性疾病中，两步法检测的敏感性超过 90%，但除外 30 天后用 IgM IB 标准判断临界值的患者。在晚期疾病中，两步法检测的敏感性接近 100%[130-131]。

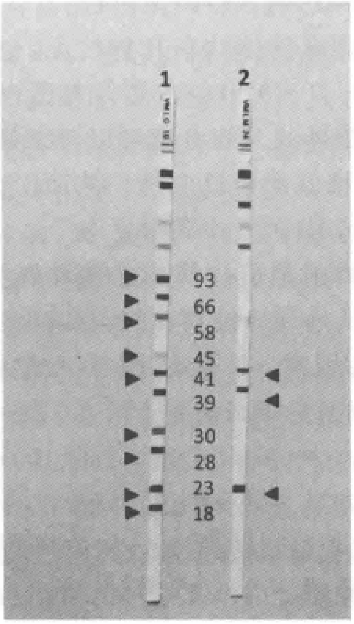


图 61-2　用 B31 菌株纯化抗原条带制备的伯氏疏螺旋体免疫印迹。(1) IgG 阳性免疫印迹显示 10 个显著条带中的 5 个；(2) IgM 阳性免疫印迹显示所有 3 个显著条带（41、39 和 23 kDa），见彩插

表 61-4　针对伯氏疏螺旋体抗体的标准两步法及改良两步法的性能

莱姆病的临床表现(n)	阳性率（敏感性和特异性）			参考文献
	标准两步法 (WCS-IB)[a]	全细胞 EIA-C6 (2 EIA)[b]	全细胞 EIA-混合型 IB[c]	
EM (106)				
EM(急性)	31	ND	34	130
EM(恢复期)	64	ND	75	
急性心肌炎/神经炎(27)	63	ND	96	
关节炎/晚期神经炎(29)	100	ND	100	
特异性	100	ND	100	
EM (114)	42	53	ND	126
急性心肌炎/神经炎(26)	73	100	ND	
关节炎/晚期神经炎(29)	100	100	ND	
特异性	99.5	99.5		
EM 急性期(40)	40～48	50	48	131
EM 恢复期(38)	61～68	79	74	
急性莱姆神经疏螺旋体病(10)	90	90	90	
心脏炎(7)	86～100	86	86	
关节炎(29)	100	100	100	
特异性	97～98	98	100	

注：[a] 全细胞 ELISA 为第一步；IgG 和 IgM 免疫印迹法为第二步（CDC 标准）。[b] 全细胞 ELISA 为第一步；C6 ELISA 为第二步。[c] 全细胞 ELISA 为第一步；IgG 免疫印迹法（含 VlsE 抗原）为第二步。早期疾病中 VlsE 存在；在急性播散性或晚期疾病中，11 个条带中有 5 个（10 个 CDC 标准显著条带＋VlsE）

两步法检测莱姆疏螺旋体病的特异性超过98%。在宫本疏螺旋体流行的地区应谨慎使用，因为在用于治疗莱姆疏螺旋体病的两步法中，大约10%的感染患者该检测呈阳性[4,97]。宫本疏螺旋体与莱姆疏螺旋体共享几种抗原，包括莱姆疏螺旋体的66、41、39 kDa和热休克蛋白；因此，感染宫本疏螺旋体的人的血清可以与莱姆疏螺旋体IB中的几种抗原产生反应性。然而，它们可能达不到阳性IgG IB的5个条带要求[97]。

欧洲莱姆疏螺旋体病的血清诊断更加复杂，因为在不同的地理区域存在引起疾病的不同莱姆疏螺旋体基因种，并且使用了大量的检测方法[134-135]。欧盟对莱姆病联合议案（The European Union Concerted Action on Lyme Borreliosis）促进了两步法方案。第一步包括特异性至少90%的ELISA，第二步包括特异性至少95%的IB。一些欧盟的检测使用有或没有添加的重组抗原全细胞制备物，该制备物包括在欧洲引起疾病的所有莱姆疏螺旋体。其他检测仅使用重组抗原。IB的结果解释根据制造商的不同而不同，因此应该参照特定试剂盒的说明书[136-137]。

（九）改良两步法

为提高早期疾病的敏感性，提议了两步法方案的修正。欧洲作者首次提议使用C6测定法作为莱姆疏螺旋体病检测的第二步[125]。使用C6为第二步的两步法，比使用IB为第二步的两步法在早期莱姆疏螺旋体病中具有更高的敏感性，同时保持了推荐的两步法的高特异性[126,131-132]（表61-4）。

两步法的其他修正包括使用了一种将VlsE作为印迹解释中抗原之一的IgG IB[130-131]。通过这种修正，在第二步中IgG对VlsE的单独反应性增加了早期疾病、包括早期播散性疾病的敏感性。对于晚期疾病，这种修正需要IgG对11种抗原中的至少5种产生反应性，11种抗原包括VlsE和IgG IB中使用的10种抗原。与标准的两步法相比，这种修正显示早期疾病、包括早期传播疾病敏感性的略有提升，同时其特异性相似或更高（表61-4）。这种方法有几个优点，包括：①避免IgM IB的使用，因IgM IB需要人工解释，并且只能在感染前30天内使用；②提高早期疾病，包括早期传播疾病的敏感性；③晚期疾病的高敏感性[132-133]。然而，包括VlsE在内的IB尚未被美国FDA批准用于患者检测。

最近，使用EIA组合作为第一步和第二步的改良两步法的应用，已经显示了与此前描述的改良两步法类似的敏感性和特异性[132]。在本研究中，血清样品采用多种双EIA法进行检测：第一步使用全细胞EIA，随后使用上市商品CLIA，该CLIA使用全长VlsE作为抗原或C6检测作为第二步。VlsE CLIA也被用作第一步，随后是C6检测。这些改良的两步法已经提高了早期莱姆病的敏感性，以及与标准两步法相似的特异性[132]。

（十）脑脊液鞘内抗体的检测

鞘内产生的莱姆疏螺旋体抗体的测定，涉及到用EIA平行测定脑脊液和血清中等量免疫球蛋白浓度的特异性抗体。计算脑脊液和血清中反应性比值以确定抗体指数（antibody index，AI）[60,138]。这种方法在欧洲患者中比在美国患者中更有价值，很可能是因为欧洲的莱姆神经疏螺旋体病的发病率更高，而且可能是由于在每个地方导致中枢神经系统表现的菌株不同。AI>1.3认为是抗体鞘内产生阳性，是欧洲确认莱姆神经疏螺旋体病的主要方法。莱姆神经疏螺旋体病检测的AI敏感性已经引起了关注。一些欧洲研究报道，重组或肽抗原检测以确认鞘内抗体存在的优越性。具有良好性能的候选抗原/肽包括DpbA、BBK32和C6[139-140]。对25例定义明确的斯洛文尼亚莱姆神经疏螺旋体病患者的研究发现，包括一些在CSF中的微生物检测和此前确认为阳性鞘内AI的患者，使用肽或重组加林疏螺旋体（菌株IP90）抗原进行检测的敏感性为88%，特异性为96%。本研究发现阳性鞘内AI的存在与病程相关，并且IgG AI优于IgM AI[141]。其他欧盟研究发现，与传统EIA平台上的重组蛋白测定相比，多重微珠检测具有更优越的性能[142]。

除了检测鞘内产生的抗体，一些研究也建议使用CSF中趋化因子CXCL13的测定。这种趋化因子是表达于次级淋巴器官的一种B细胞趋化因子，次级淋巴器官在特异性免疫反应可检测到之前，可能以增加的水平发现。在100pg/ml的临界值下，在30例疑似莱姆神经疏螺旋体病患者和45例对照组中，敏感性和特异性分别为73%和87%[143-145]。

十一、抗菌药物敏感性试验

疏螺旋体属成员主要发现于野生动物库中；因此，其不大可能受到抗菌药物压力，也不大可能获得耐药性。它们总是对四环素和头孢菌素、氨基青霉素等β-内酰胺类抗生素敏感[146]。回归热的首选治疗方法是四环素，尽管其使用与较高赫克斯海默尔反应(Jarisch-Herxheimer reaction)的发生率相关，但该反应可能会危及生命[32]。多西环素已成功用于治疗蜱传回归热，是治疗莱姆疏螺旋体病的首选抗菌药物。β-内酰胺类抗生素也也用来治疗莱姆疏螺旋体病，尤其是儿童。肠外注射头孢曲松是治疗莱姆神经疏螺旋体病的首选药物[147]。

十二、结果的评价、解释和报告

虽然支持莱姆疏螺旋体病诊断的最常用方法涉及抗体的检测，但在研究领域和商业实验室中，在临床样品中莱姆疏螺旋体直接检测的方法已在应用。在控制良好的研究领域中，这些方法的使用可提供最佳性能。在未选择的人群中，特别是在血液和脑脊液中，NAAT使用的产出非常低，其使用应劝阻。一些莱姆“专业”实验室使用非FDA批准的，包括莱姆疏螺旋体培养的方法，这些方法已发现产生可疑的结果[148]。

莱姆疏螺旋体病血清学诊断在早期疾病中有较低的敏感性，但由于EM的诊断是基于临床表现，因此这不构成局限性。然而，在美国的大多数抗体检测是在EM患者中完成的[149]。在晚期莱姆疏螺旋体病中，IgG抗体几乎可以在100%的病例中检测到，而IgM不能用于诊断晚期疾病。因此，一个阴性血清学检查不能排除早期感染，但是具有晚期临床表现的血清阴性结果的可能性极低。无论患者是接受过充分治疗或自身痊愈，抗体检测都可以作为具有临床表现或既往感染的证明。如果抗体检测为阴性，且进一步怀疑早期莱姆疏螺旋体病，则应在2～4周后再次采集血样。IgG甚至IgM抗体在治疗成功后可长期存在；因此，它们不应该用来监测治疗效果。重复检测独立的IgM抗体，但不检测IgG抗体，表明存在主动感染或隐性感染。在接受和推荐新的抗体检测方法之前，应使用符合CDC标准的两步法以支持莱姆疏螺旋体病的临床诊断。虽然在早期疾病中有较低的敏感性，但其已被证明具有最佳的特异性。对于任何传染病，都可以在恢复期确认到抗体。应尽量避免在IB中给弱带评分，并在需要时使用密度计作为客观解释工具。

血清学不适用于表现为不明确病情的患者，特别是来自宿主和有效媒介都不存在地理区域的那些患者。即使在最佳条件下，两步法99.5%的特异性也会导致假阳性的出现。据估计，美国每年有近300万例莱姆疏螺旋体病血清学试验；因此，15 000个结果可能是假阳性[150]。

参考文献请扫二维码查阅

第62章　密螺旋体和短螺旋体、以人为宿主的相关螺旋体

ARLENE C. SEÑA，ALLAN PILLAY，JUSTIN D. RADOLF

（彭静　译；苏建荣　审校）

一、分类

人们对于螺旋体作为人类宿主相关生物体的认识可以追溯到近400年前，当时Van Leeuwenhoek将其描述为存在于人类口腔菌斑中形如螺旋、运动敏捷的"微生物"，而另外一些光学显微学先驱则将人类粪便中螺旋体进行了直观描述[1-2]。螺旋体间分类关系的确定因其生长条件苛刻且多难以培养而变得很复杂。人们曾尝试通过检测螺旋体的大量表型特征来建立其分类体系[3]。Paster等[4]证实，依据16s rRNA序列，螺旋体可被归类为单一的门，包含5个簇(cluster)：密螺旋体属(*Treponema*)、螺旋体属(*Spirochaeta*)、疏螺旋体属(*Borrelia*)[现为莱姆病螺旋体(*Borreliella*)和回归热螺旋体(*Borrelia*)]、蛇形螺旋体属(*Serpulina*)[现为短螺旋体属(*Brachyspira*)和细螺旋体属(*Leptospira*)]。各个簇成员间的亲缘关系相差很大。疏螺旋体的种间相似性大于97%，反映了近期的进化多样性。相反，密螺旋体间约10%的序列差异反映了在一个更大进化时间范围内的序列多样性。这一结论与密螺旋体所共生的脊椎动物和无脊椎动物宿主的多样性一致[5]。

研究人员曾认为，可培养的密螺旋体是一类紧密相关的非致病形式的梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)[6]。但Miao和Fieldsteel[7-8]推翻了这个观点，他们利用DNA-DNA杂交技术证实梅毒螺旋体(*T. pallidum*)、尼克尔斯(*Nichols*)株的DNA与可培养密螺旋体的DNA间同源性<5%，但与极细螺旋体(*Treponema pertenue*)(雅司病，yaws)株间则难以区分。他们的工作使得性病梅毒、地方性梅毒和雅司病的病原体被重新分类，分别为苍白螺旋体/梅毒螺旋体苍白亚种(*T. pallidum* subsp. *Pallidum*)、地方亚种(*Endemicum*)和极细亚种(*Pertenue*)。然而，皮肤品他病的病原体-品他螺旋体(*Treponema carateum*)，因没有分离株可供研究而仍保留为不同的种[9]。齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)一直被视为口腔密螺旋体的原型，它的存在与牙周病高度相关[10-11]；然而，这个菌种仅代表一小部分常驻于牙龈炎和牙周炎患者牙齿中的密螺旋体种系型，且大部分不能培养[12-13]。1997年，所有蛇形螺旋体属(*Serpulina*)种被重新归类为短螺旋体属(*Brachyspira*)[14]。猪痢疾短螺旋体(*Brachyspira hyodysenteriae*)是引起猪痢疾(一种严重的黏膜出血性结肠炎)的病因，而多毛短螺旋体(*Brachyspira pilosicoli*)则被认为是引起猪、鸡和狗腹泻的病原体[2,15-16]。有3种短螺旋体(*Brachyspira*)与人类肠道螺旋体病(human intestinal spirochetosis)相关，即阿尔堡短螺旋体(*B. aalborgi*)、多毛短螺旋体(*B. pilosicoli*)和暂命名的"人型短螺旋体(*B. hominis*)"[2,15,17-18]。

二、病原体描述

(一)苍白螺旋体(*T. Pallidum*)亚种

引起性病梅毒、地方性梅毒、雅司病和品他病的4种密螺旋体属成员在形态学上表现相同，在基因组水平上也有超过99%的同源性[19]。传统上，这些病原体的鉴别主要依赖于它们在地理分布、流行病学、临床表现及实验动物宿主方面的差异[20]。然而，最近，基因组学的发展使得开发遗传

学方法用于鉴别临床标本中的致病性密螺旋体成为可能[21]。苍白螺旋体苍白亚种（*T. pallidum* subsp. *pallidum*）和苍白螺旋体极细亚种（*T. pallidum* subsp. *pertenue*）的基因组高度相似，提示这些差异仅仅源于相对较少的遗传位点的多态性，并且这些多态性位点多与已知或推定的外膜蛋白相关[22]。只有苍白螺旋体苍白亚种常通过性接触传播及母婴垂直传播[23-24]。它也是唯一能常规突破血-脑脊液屏障的苍白螺旋体亚种[24-25]。苍白螺旋体苍白亚种的 Nichols 株于 1912 年从一个二期梅毒患者的脑脊液（cerebrospinal fluid，CSF）中分离得到[26]，此后一直通过兔睾丸内接种进行繁殖[27]。尽管通过与哺乳动物细胞共培养实现了有限的复制[28-29]，但仍没有一个梅毒螺旋体（*T. pallidum*）株或亚种能够在体外进行连续培养。长期以来，兔一直是研究梅毒感染的首选动物，而兔接种[兔感染性试验（rabbit infectivity testing，RIT）]是唯一可从临床标本中分离菌株的方法（译者按语：将患者组织或体液注入兔睾丸内，120 天后从淋巴结等组织中分离菌株）[30]。然而，兔子模型在多大程度上重现人类梅毒仍是一个有争议的问题。

(二)宿主相关的螺旋体

梅毒螺旋体（*T. pallidum*）直径约为 0.2 μm，两端呈锥形，长 6～20 μm（图 62-1*）。因其直径小，致病性密螺旋体不能在明场显微镜下直接观察，也不被革兰染料着色。因此，梅毒螺旋体最好在相差显微镜或暗视野（DF）显微镜下观察。梅毒螺旋体细胞通常由波长 1.5 μm、波幅约 0.3 μm 的 6～14 个平波组成（图 62-1）[31]。冷冻电子显微镜显示其末端由超微结构复杂的锥体组成，与它们作为附着器的功能相一致[31-32]。

梅毒螺旋体生长缓慢（在兔体内中的倍增时间为 30～33 h[33]），对干燥、高温和高氧压耐受性差[34]。梅毒螺旋体曾被认为是一种厌氧生物。后因其在氧浓度为 3%～5%的体外环境中具有最佳复制能力而被重新归类为微需氧微生物[34]。这一氧浓度值与在哺乳动物组织中测量的氧浓度值非常接近[35]。梅毒螺旋体主要（即便不完全）依赖糖

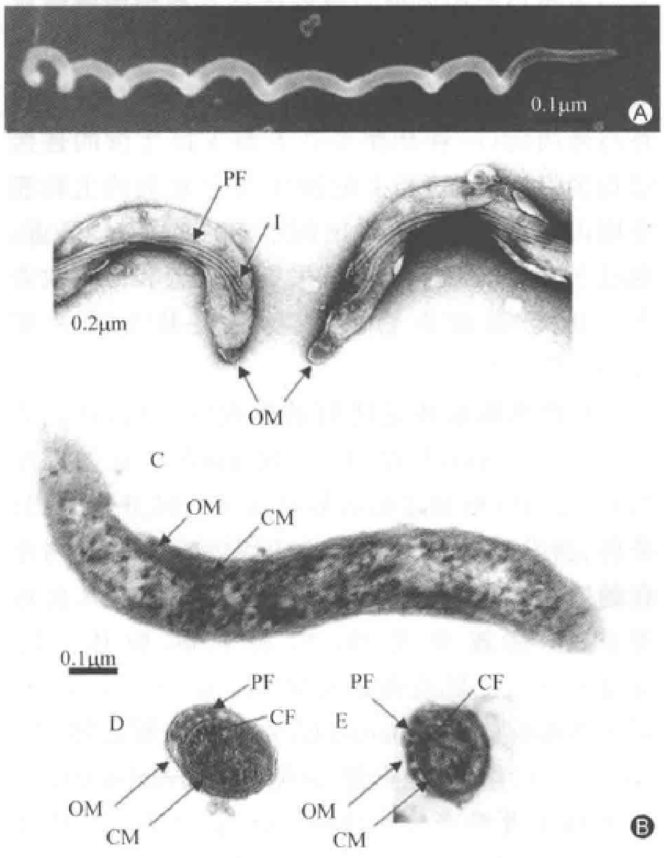


图 62-1 Morphology of *T. pallidum*. (A) Scanning electron micrograph showing largely planar wave. (B) Negatively stained view of the tips of two organisms. Note the insertion points (I) of periplasmic flagella (PF) near the ends. (C to E) Electron micrographs of ultrathin sections, showing the outer membrane (OM), the cytoplasmic membrane (CM), periplasmic flagella (PF), and the location of the cytoplasmic filaments (CF). Bars, 0.1 mm. Reprinted from reference 227 with permission of Kluwer.

酵解途径产生 ATP，其无法合成脂肪酸、核苷酸、酶辅助因子和大多数氨基酸[22, 34, 36]。事实上，梅毒螺旋体必须从它专属的人类宿主那里获得广泛的营养物质，这意味着它拥有一系列不同的转运蛋白，将这些分子在它的外膜和细胞质膜之间穿梭运送[22, 36]。梅毒螺旋体的分子结构和细胞膜组成与革兰阴性菌明显不同[22]。除缺少脂多糖[36]，其外膜还包含一种极低密度的内在膜蛋白[22]。而许多细菌的主要免疫原均为参与胞质膜间营养物质运输的、经脂质修饰的胞质底物结合蛋白[22]。

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

人类口腔中发现的螺旋体种系型均为密螺旋体属(*Treponema*)[12]。口腔密螺旋体在人类正常的口腔微生物群中只占很小却很重要的一部分,在与牙周病(一种牙龈及其下面支撑牙齿的连接结构的慢性炎症)相关的微生物学复杂的生物膜中则占较大比例(虽然比例不定)[12,37-39]。最近,通过16S RNA扩增,已从采集狩猎者和传统农业人口的肠道微生物群中鉴定出共生的密螺旋体[40-41]。

口腔密螺旋体是厌氧的螺旋形生物,直径为0.15~0.30 μm,长度为5~16 μm[42]。除基因序列外,还可以根据生化参数对其进行区分,如生长条件、糖发酵特征及酶活性[9,12,43]。在口腔内存在的近100个"物种级"密螺旋体种系型中,仅培养出相对较少几种:口腔密螺旋体(*T. denticola*)、食果胶密螺旋体(*T. pectinovorum*)、索氏密螺旋体(*T. socranskii*)、文氏密螺旋体(*T. vincentii*)、解卵磷脂螺旋体(*T. lecithinolyticum*)、嗜麦芽糖密螺旋体(*T. maltophilum*)、中间密螺旋体(*T. medium*)、微细密螺旋体(*T. Parvum*)、恶臭密螺旋体(*T. putidum*)和噬淀粉密螺旋体(*T. amylovorum*)[11,13,44]。多位点序列分析表明,已知的种系型可被归类为2个不同的种系群,分别以文氏密螺旋体(种系群1)和口腔密螺旋体(种系群2)为代表[44]。作为原型菌株的口腔密螺旋体可与宿主细胞和细胞外基质成分紧密结合,并被证实能够产生多种分子,其中许多为蛋白酶,据信具有毒力因子的功能。口腔密螺旋体还可与其他牙周病相关细菌[牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)和具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)]发生共聚集[11,45]。密螺旋体在牙周袋中大量繁殖的能力也可以归因于它们能够在容易出血的炎性牙龈组织中逃避补体介导的杀伤[46-47]。虽然侵袭力远不及梅毒螺旋体,口腔密螺旋体在SCID小鼠模型中仍表现出一定程度的血行播散[48]。

短螺旋体(*Brachyspira* spp.)为耐氧的厌氧菌,可通过表型生长特征、β-溶血程度予以鉴别[2]。阿尔堡短螺旋体(*B. aalborgi*)于1982年从肠道螺旋体病患者的直肠活检标本中首次分离得到,至今尚未在非人灵长类动物以外的动物中发现或分离[49-50]。典型的菌株呈逗点状或螺旋形,长2~6 μm,宽约0.2 μm,两端呈锥形,且每端有4根鞭毛[51]。菌株的分离需要在厌氧条件下孵育数周[52]。目前还没有用于研究阿尔堡短螺旋体所致疾病的实验动物模型[15]。多毛短螺旋体(*B. pilosicoli*)可在许多动物物种的大肠中定植,对人类的致病潜力被认为大于阿尔堡短螺旋体[15,53]。与阿尔堡短螺旋体相比,多毛短螺旋体更长(4~12μm)、更卷曲、两端更尖[54]。在血琼脂平板上,多毛短螺旋体分离株呈现出两种形态不同的弱β-溶血的菌落类型[55]。肠道螺旋体可见于结肠的所有区域,其数量从盲肠到直肠逐渐增加[56]。肠道螺旋体定植于微绒毛所环绕的刷状缘,其近端嵌入宿主细胞膜的内陷处(图62-2*)。由于它们的密度高且垂直于黏膜表面分布,肠道螺旋体会形成特有的嗜碱性边缘,在经苏木素和伊红染色的组织标本中常被描述为"假刷状缘"(图62-2*,顶部)[56]。人短螺旋体已经通过分子生物学手段鉴定,并通过荧光原位杂交在结肠活检组织中显示出来[18,57]。

三、流行病学和疾病传播

(一)性病梅毒

据世界卫生组织(World Health Organization,WHO)估计,2012年全球15~49岁的成年人中约有1800万梅毒流行病例和560万新发病例[58]。大多数病例发生在欠发达国家,尤其是非洲和东南亚。东欧和俄罗斯有报道称,随着苏联解体,梅毒发病率急剧增长[59]。在过去20年中,中国的梅毒发病率出现了惊人的增长,这要归因于该国巨大的社会和经济变化[60]。2008年,全球估计约有140万孕妇患有活动性梅毒,造成大量的围产儿发病和死亡,而这些严重后果本可以通过早期检测和治疗而避免[61]。

20世纪40年代末,美国的梅毒发病率随着青霉素的使用而急剧下降,到20世纪50年代降至最低点[62],随后又开始上升,大约每10年出现一

---

*译者注:原著引用其他著作图,未经原作者授权翻译,故此保留原图

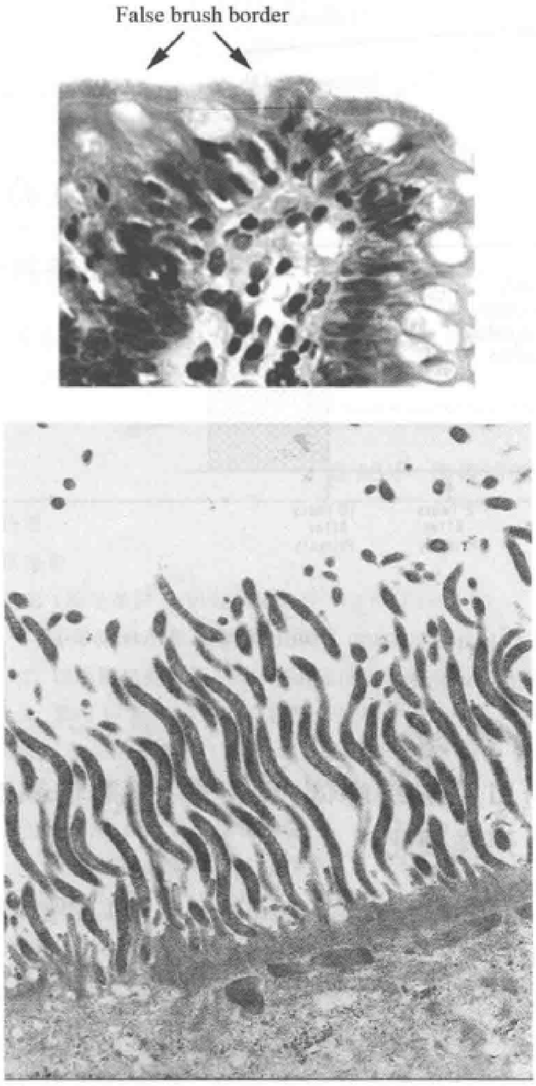


图 62-2　Human intestinal spirochetosis. (Top) hematoxylin and eosin staining of a colonic biopsy sample showing a false brush border covering the luminal surface of the colon as observed by light microscopy. Reproduced from reference 170 with permission from Blackwell Publishing Asia Pty Ltd. (Bottom) Transmission electron micrograph showing *B. aalborgi* attached end-on to the colonic mucosa, forming a "false brush border." Magnification, ×11 000. Reproduced from reference 126 with permission from the American Society for Microbiology.

次发病高峰（所有峰值水平均远低于无青霉素时代的水平）。20 世纪 80 年代末至 90 年代初，"以性换毒"的可卡因相关性梅毒暴发流行，之后梅毒发病率稳步下降[63]。2001－2009 年，由于男同性恋(men who have sex with men，MSM)之间危险性行为的死灰复燃，美国一、二期梅毒发病率稳步上升[64-65]。2016 年，梅毒发病率继续上升，男同性恋者占病例的大多数，罹患一、二期梅毒的男女比例为 8∶1，而 2000 年为 2∶1[66] (https://www.cdc.gov/std/stats16/ Syphilis.htm)。2015 年，男同性恋者一、二期梅毒的总体发病率是只与女性发生性行为男性的 106.0 倍，是女性的 167.5 倍[67]。在美国，先天性梅毒仍然是围产儿发病和死亡的重要的可预防因素；1999－2013 年，共有 6383 例先天性梅毒病例被报道，病死率为 6.5%[68]。艾滋病病毒感染和梅毒之间的统计关联在艾滋病流行之初就变得显而易见[69]，并被归因于行为学和生物学因素[70]。相似的高危行为促进了 HIV 和梅毒螺旋体的传播。生殖器溃疡可破坏保护性黏膜屏障，募集 HIV 易感的 CD4/CCR5 阳性免疫细胞及增加 HIV 从生殖道排出，从而促进 HIV 感染和传播[71]。一项对全球罹患 HIV/AIDS 的成年患者进行研究的综述报告，梅毒的中位患病率为 9.5%[72]。2016 年，美国男同性恋者中 47.0%的一期和二期梅毒病例为 HIV 阳性（https://www.cdc.gov/std/stats16/natoverview.htm）。

性接触是梅毒传播的主要方式，其中一期和二期梅毒的渗出性病灶传染性最强（图 62-3*）。然而，对性传播梅毒风险的估计差异很大，从 10%到 80%不等；Schroeter 等[73]报道的 30%的传播率是被普遍接受的估计值[74]。梅毒通过胎盘引起的垂直传播早在几个世纪前就被认识到[23]。此外，新生儿也可通过接触病灶渗出物或产道内受染的母体血液而感染梅毒[23]。自 20 世纪 40 年代以来，由于对供者血液的常规检测和对血液制品的冷冻处理，在美国通过输血传播梅毒的情况微乎其微[75]。然而，在筛查程序不充分的欠发达国家，输血相关的梅毒仍然是一个令人担忧的问题[76]。现在，通过实体器官移植传播梅毒的情况已很少见[77]。

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

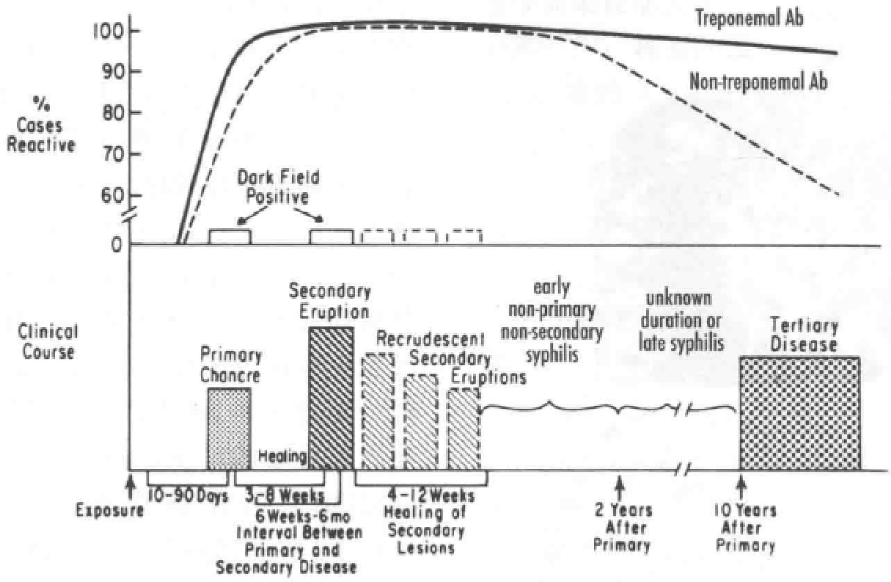


图 62-3 The natural course of untreated syphilis. Reprinted with permission from *Zinnser Microbiology*, 20th edition (228) and modified to include new CDC terminology for syphilis staging

(二)地方性密螺旋体病

据 WHO 估计，在青霉素出现之前，全球约 2 亿人在其一生中曾暴露于地方性梅毒。20 世纪 50 年代初，WHO 和联合国儿童基金会发起了一项极其成功的运动，在大约 10 年的时间里将地方性密螺旋体病的全球流行率降低了 95%以上[78-79]。遗憾的是，部分地区的卫生服务无法维持这些成果。雅司病死灰复燃，目前被认为是西非、东南亚和太平洋地区至少 12 个国家的地方病，大多数病例集中在加纳、巴布亚新几内亚和所罗门群岛[78-79]。血清学调查和分子生物学研究表明，苍白螺旋体极细亚种(*T. pallidum* subsp. *pertenue*)的感染在非洲的非人灵长类动物中非常普遍，这增加了非人灵长类动物作为感染的地方性动物病源的可能性[80-82]。品他病局限于偏远的中、南美洲的原住民[20]。与雅司病和品他病相反，地方性梅毒(或非性病性梅毒)是一种发生于气候干热国家的疾病；地方性梅毒的主要疫源地仍位于非洲萨赫勒地区[20]。雅司病和品他病的病原体传播主要发生在儿童或青少年的早期阶段，通过人与人之间非性行为的直接接触渗出性病灶而传播。地方性梅毒也可通过接触患者皮肤、黏膜的感染灶或通过共用餐饮具而传播[20]。

(三)口腔密螺旋体：牙龈炎、牙周病和动脉粥样硬化

齿垢密螺旋体(*T. denticola*)和其他口腔密螺旋体的流行病学重要性在很大程度上是因为它们是引起牙龈炎和牙周炎的多种微生物聚生体的成员[38-39]。牙龈炎在全球儿童和成年人中普遍存在，并与不良的口腔卫生有关；全面的口腔卫生计划能有效预防或减少牙龈炎[83]。慢性牙周炎在成年人和老人中最为常见，有吸烟、肥胖、糖尿病和饮酒者更甚[84]。针对就业成年人和老年人的全国性调查，以及第三次全国健康和营养调查(NHANES Ⅲ)发现，24%的就业成年人和超过 60%的老年人患有牙周病[85-86]。现有大量证据表明，牙周疾病和动脉粥样硬化性血管疾病之间存在流行病学联系，不受吸烟和肥胖等混杂因素的影响[39]，对牙周炎的治疗降低了全身炎症和动脉粥样硬化的生物指标[87]。

(四)肠道螺旋体病

在 20 世纪，螺旋体的肠道定植率在发达国家虽然急剧下降，但在发展中国家仍然保持高水平[2, 56]。缺乏动物宿主的阿尔堡短螺旋体(*B. aalborgi*)很可能通过粪口途径传播[53]。多毛短螺旋体(*B. pilosicoli*)感染则可能因为饮用了被鸟类、动物或患者粪便污染的水源[2]。在发达

国家,无论有无合并 HIV 感染,肠道螺旋体病的组织学证据在 MSM 人群中的流行率最高,而口-肛接触可能为该病的传播途径[2,55]。

四、临床意义

(一)性病梅毒

图 62-3 显示未经治疗的梅毒的自然病史,强调了疾病在传染性和非传染性阶段与血清学试验反应性之间的关系(见下文)。表 62-1 提供了最近更新的美国 CDC 用于报告和监测的梅毒病例的定义,其中术语早期潜伏梅毒和晚期潜伏梅毒分别被更改为"早期非一、二期梅毒"和"未知病程或晚期梅毒"。做出这些改变是为了从病例定义中删除术语"潜伏",以阐明某些临床表现(例如,神经梅毒、眼部梅毒)可能发生在梅毒的任何阶段(https://www.cdc.gov/std/stats/DCL-syph-case-def-sept-4-2017.pdf)。

表 62-1　梅毒的临床和实验室诊断标准(病例定义)[a]

早期梅毒
- 一期梅毒
  - 确诊(满足条件 1,同时满足条件 2、3 中任一条件)
    1. 一个或多个硬下疳(溃疡)
    2. 暗视野显微镜下在非口咽、未受粪便潜在污染的临床标本中检出梅毒螺旋体(*T. pallidum*)
    3. 采用 PCR 或等效的直接分子生物学方法在任何临床标本中检出梅毒螺旋体 DNA
  - 疑似(要求满足条件 1,同时满足条件 2 和 3 中任一条)
    1. 一个或多个与硬下疳相符的病损
    2. 非密螺旋体试验具有反应性
    3. 密螺旋体试验具有反应性
- 二期梅毒
  - 确诊(满足条件 1,同时满足条件 2、3 中任一条件)
    1. 与二期梅毒相符的局限性或弥漫性皮肤黏膜病变
       a. 斑疹、丘疹、滤泡、丘疹鳞屑或脓疱疹
       b. 扁平湿疣(肛门生殖器区或口腔)
       c. 黏膜斑(口咽或宫颈)
    2. 暗视野显微镜下在非口咽、未受粪便潜在污染的临床标本中检出梅毒螺旋体
    3. 采用 PCR 或等效的直接分子生物学方法在任何临床标本中检测到梅毒螺旋体 DNA
  - 疑似(满足条件 1 和 2)
    1. 与二期梅毒相符的皮肤黏膜损害
    2. 非密螺旋体试验检出反应性滴度,并且确证性密螺旋体试验具有反应性
- 早期非一、二期梅毒
  - 疑似(满足条件 1、4,同时满足条件 2、3 中任一条)
    1. 无一期、二期梅毒的临床症状和体征
    2. 无既往梅毒病史,当前密螺旋体和非密螺旋体试验具有反应性
    3. 有既往梅毒病史,且当前非密螺旋体试验抗体滴度较上一次试验升高>4 倍(除非滴度持续升高时间≤2 周)
    4. 在过去 12 个月内至少有一项基于以下条件的梅毒感染的证据
       a. 在过去 12 个月内有记录表明非密螺旋体试验血清学阳转或抗体滴度增加≥4 倍(除非滴度持续升高时间≤2 周)
       b. 在过去 12 个月内有记录表明密螺旋体试验血清学阳转
       c. 在过去 12 个月内有与一期、二期梅毒相符的症状史
       d. 满足流行病学标准:

· 过去 12 个月内与患有一期梅毒、二期梅毒或早期非一、二期梅毒的伴侣发生性接触(记录时间在 12 个月内)或

· 在过去 12 个月内只有性接触(首次性行为)

未知病程或晚期潜伏梅毒
- 疑似(同时满足条件 1 和 2)
  1. 无一期或二期梅毒的症状/体征;符合以下其中一种情况

（续 表）

a. 无既往梅毒病史，当前密螺旋体和非密螺旋体试验具有反应性
b. 有既往梅毒病史，且当前非密螺旋体试验抗体滴度较上一次升高>4 倍(除非滴度持续升高时间≤2 周)
c. 临床症状/体征和实验室结果符合神经系统、眼部、耳部或晚期梅毒临床表现的可能的或经核实的标准
2. 在过去 12 个月内有感染梅毒的证据(根据至少一条上述早期非一、二期梅毒的诊断标准)
神经性梅毒
确诊（满足条件 1、2，同时满足条件 3、4、5 之任一条）
1. 临床体征与神经性梅毒相符，且无其他已知异常原因
2. 当前血清密螺旋体和非密螺旋体试验具有反应性
3. CSF-VDRL 试验具有反应性
4. 采用 PCR 技术在 CSF 中检测到梅毒螺旋体 DNA
5. 在经银染或免疫组织化学染色的神经组织中检出密螺旋体
疑似（同时满足条件 1、2 和 3）
1. 临床症状与神经性梅毒相符，且无其他已知异常原因
2. 当前血清非密螺旋体和密螺旋体试验具有反应性
3. 无其他已知原因引起的 CSF 蛋白质含量升高(>50 mg/dl)或白细胞计数增加(>5×10^6/L)
可能（同时满足条件 1 和 2）
1. 临床体征与神经梅毒相符，且无其他已知异常原因
2. 当前血清密螺旋体和非密螺旋体试验具有反应性
先天性梅毒：新生儿
确诊（满足条件 1，同时满足条件 2、3 中任一条件）
1. 临床相符病例（如肝脾大、皮疹、扁平湿疣、黄疸或者贫血）
2. 在病灶、羊水(产前)、胎盘、脐带、鼻分泌物或尸检标本中直接镜检到梅毒螺旋体
3. 采用 PCR 技术在病灶、组织、血液和(或)CSF 中检出梅毒螺旋体 DNA
疑似（满足条件 1 或 2，同时满足条件 3）
1. 无论婴儿的检测结果如何，婴儿母亲在分娩时有未经治疗或治疗不充分的梅毒
2. 婴儿或儿童密螺旋体试验具有反应性
3. 下列附加标准之一
a. 体检时发现有先天性梅毒的临床症状和体征
b. 长骨 X 线片显示有先天性梅毒的证据
c. 无其他原因引起的 CSF 蛋白质或细胞计数异常
d. CSF-VDRL 具有反应性
梅毒性死胎
1. 妊娠 20 周后发生胎儿死亡
2. 胎儿体重>500 g，胎儿母亲在分娩时患有未经治疗或治疗不充分的梅毒

注：[a] 这些标准以 2018 年针对美国国家应通报的性传播疾病监测病例定义为基础进行了修改（http://c.ymcdn.com/sites/www.cste.org/resource/resmgr/2017PS/2017PSFinal/17-ID-11.pdf）

早期梅毒通常在感染梅毒螺旋体后数天至数周开始出现一处或多处皮肤黏膜损害[74]。一期梅毒时，螺旋体在感染部位复制，引起局部炎症反应，形成一个或多个一期梅毒标志性病变硬下疳。螺旋体播散所引起的临床后果，统称为二期梅毒，在硬下疳出现 4～10 周后表现明显。由于硬下疳往往无痛且在女性患者中常表现不明显，因此女性多表现为二期梅毒症状；由于同样的原因，MSM 人群也有类似的倾向[88-89]。二期梅毒可以影响人体任何器官[74]；然而，到目前为止最常见的临床表现为皮肤黏膜损害，包括涉及手掌和脚底的斑丘疹。二期梅毒的皮损通常在 3～12 周内消退，进入无症状期。在 Oslo 针对未经治疗梅毒的研究表明，25%的患者经历了二次复发，大多在第一年内发生，但也有晚至 5 年后复发的病例[90]。

在后抗生素时代，所有形式的三期梅毒发病率都已显著下降。梅毒瘤是一种大的坏死性肉芽肿病变，可累及皮肤、骨骼、内脏或中枢神经系统[91-92]。由于主动脉血管壁(血管滋养管)的持续感染，心血管梅毒常表现为主动脉瓣关闭不全、冠

状动脉狭窄和(或)主动脉瘤[93]。神经梅毒综合征被分为临床表现高度重叠的五大类型:无症状性、脑膜性、脑脊膜血管性、脑实质性和梅毒瘤性神经性梅毒[94]。

一项多中心、前瞻性、随机的梅毒治疗试验发现,HIV 感染对早期梅毒临床表现的影响微乎其微[95-96]。然而,有报道称,HIV 感染者在感染梅毒后的 12 个月内可出现早期神经梅毒症状,这在 HIV 阴性患者中较为罕见[94]。最近的研究还表明,在 HIV 感染的患者中,眼部梅毒和梅毒性肝炎的发生率较高[97-98]。

大多数先天性梅毒患儿出生时无症状[23]。早期先天性梅毒类似二期梅毒,可累及任何胎儿器官,最常见的受累器官是肝、肾、骨、胰、脾、肺、心脏和大脑[23,99]。两岁龄是界定早期和晚期先天性梅毒的分界点。晚期先天性梅毒相当于成年人的三期梅毒。晚期先天性梅毒最显著的特征是哈钦森(Hutchinson)牙、间质性角膜炎、鞍鼻畸形、额部隆起和军刀状胫骨。

(二)地方性密螺旋体病

一期雅司病表现为感染部位的单个丘疹,进而扩大为高度角化的乳头状瘤("初发雅司疹"),最后形成可持续数月至数年的浅表溃疡或凹形瘢痕[78]。传染性极强的二期病变出现在数周至数月后,常伴随近端趾/指骨或长骨的早期骨膜炎[78]。经过数年感染的反复发作,患者进入无症状的潜伏晚期;约 10%未经治疗的患者发展为三期病变,常出现骨骼或皮肤黏膜表面孤立的破坏性病损。

地方性梅毒通常起病于无明显原发病灶的全身性感染,其特征为口咽黏膜溃疡性病变(黏膜斑)、伴有嘴角处皲裂性丘疹的口角炎、叉指尖锐湿疣(intertrigital condylomata)(类似于性病梅毒)、疼痛性骨膜炎和皮疹[20]。三期梅毒瘤,最常见于皮肤、鼻咽和骨骼,可能会导致严重的毁容。

品他病的独特之处在于其仅局限于皮肤[20]。一期品他病的最初病变为小丘疹,在经历 1 周到 4 个月的潜伏期后出现。二期病变(品他疹)通常出现在 2~6 个月之后。三期病变由界限清楚的深色、浅色、无色或者变色的斑块组成。

(三)肠道螺旋体病

1967 年,Harland 和 Lee[100] 创造了"肠道螺旋体病"一词来描述大肠的一种非炎性状态,即螺旋体以密集的栅栏状排列方式将其末端黏附于结肠上皮上,形成一个嗜碱的"假刷状缘"(图 62-2,上图)。尽管在 100 个连续活检标本中发现有 9 个标本含有螺旋体,但他们无法将这些发现与症状学联系起来。多年来,人们对肠道螺旋体的系统发育特征及生化特性已有大量描述,螺旋体的分离和(或)检测方法也不断改进。然而,关于人类肠道螺旋体病临床意义的困惑和争议并未减少[2,15,18,101]。虽然通常表现为非侵袭性和轻微炎症,但已观察到短螺旋体(*Brachyspira* spp.)所致的隐窝脓肿、溃疡和坏死[102]。伴多器官衰竭的螺旋体菌血症也有报道[15,103]。

五、标本的采集、运输和储存

(一)梅毒螺旋体:梅毒

由于梅毒螺旋体(*T. pallidum*)不能在人工培养基上培养,梅毒的诊断必须依赖于从临床标本中直接检出密螺旋体和(或)血清学试验具有反应性[104-105]。采用何种直接检测方法取决于疾病的不同阶段、临床表现和获得的标本类型。病灶渗出物中梅毒螺旋体(*T. pallidum*)可采用 DF 镜检或者 PCR 检测。组织活检很少用于生殖器溃疡,但可用于二期、三期梅毒的非生殖器临床症状的诊断,通常在怀疑有梅毒(通常是恶性肿瘤)以外的其他疾病存在时进行。PCR 既可以在固定的组织上进行,也可以在非固定的组织上进行,尽管后者更适宜。常规情况下不推荐对 CSF 进行 PCR 检测,因为在相当大比例的缺乏神经系统症状或发现的早期梅毒患者的脊髓液中存在密螺旋体[95,104]。其他标本,如淋巴结抽吸物和羊水,虽然很难获得,仍可采用 DF 镜检法和 PCR 进行检测,而胎盘或脐带组织则可采用银染、免疫组织化学(immunohistochemistry,IHC)和 PCR 进行检测[23]。

从生殖器溃疡或湿性病灶采集标本的顺序取决于所要施行的检测方法。应首先采集标本用于 DF 镜检(见下文),然后是 PCR。理想情况下,用于 DF 镜检的标本应不含红细胞、其他微生物及组织碎片。在采集用于 PCR 的浆液性渗出物时,无菌涤纶或带棉头的拭子应紧沿溃疡或病灶的底部转动。然后将拭子悬浮于含有 1~2 ml

核酸转运培养基，如 AssayAssure Multilock（Sierra Molecular Corporation，Sonora，CA）或通用转运培养基（Copan Diagnostics，Murrieta，CA）的冷冻管中。用于银染或 IHC 的组织或细针抽吸物（如淋巴结）应尽快放入含 10%福尔马林的缓冲液中于室温下固定，然后运送至实验室进行石蜡包埋、切片和染色。为诊断先天性梅毒而对妊娠产物进行检测时，应在分娩后尽快获取胎盘远端 3～4 cm 的脐带切片并按上述方法进行处理。

Wheeler 等[106]详述了用于 DF 镜检的标本采集流程。通过向 stdlaboratoryspecim@cdc.gov 发送请求，可以免费从 CDC 获得分步教学视频。简言之，用生理盐水润湿的无菌纱布轻轻地清洗和摩擦采集部位，直到出现浆液；然后将标本收集到干净的载玻片，并贴上盖片。用于 DF 镜检的标本应在 20 min 内检测，因为梅毒的诊断依赖于发现活动密螺旋体。如果检测延迟超过 4h，血清、血浆和 CSF 应存储于 4℃，如果检测于采样 5 天后进行，则标本应置于－20℃或更低温度中。如果不能立即进行 PCR 检测，未固定的组织、溃疡渗出物、皮肤或黏膜病灶、CSF、羊水标本应存储于－80℃。经福尔马林固定的标本在包埋、切片或 DNA 提取之前应置于室温。

如果标本必须运送到不同的实验室进行分析，事先冷冻的血浆或血清则须采用干冰运送。如果检测就地进行，用于血清学试验的全血可以在室温下转运；否则，样品应储存于 4℃并与冷袋一起连夜运送。用于血清学试验的 CSF 可以在室温下连夜运送；如果 CSF 还用于 PCR 检测则样本应置于冰袋或者干冰上。对于 PCR 检测，采集于 AssayAssure 或通用转运培养基的标本可以在室温下或者与冷袋一起连夜运送。福尔马林固定的组织标本则可以在室温下运输。

血清是传统密螺旋体和非密螺旋体试验首选的样本类型，但血浆也可用于一些酶免试验（enzyme immunoassays，EIAs）及新的密螺旋体试验（见下文的血清学测试）。血浆可用于快速血浆反应素试验（rapid plasma reagin，RPR）和甲苯胺红不加热血清试验（toluidine red unheated serum test，TRUST），但不能用于性病研究实验室（Venereal Disease Research Laboratory，VDRL）试验，因为加热灭活血浆会促进纤维蛋白形成，导致假阳性结果。血浆应在 24h 内检测，以避免假阳性检测结果。手指针刺全血、血清或血浆均可用于快速梅毒试验。然而，多种快速试验已被证明用于血清样本检测时具有更高敏感性[107]。用于 PCR 检测的全血应收集在含有 EDTA 作为抗凝剂的试管中，如果无法立即进行 PCR 检测，则应保存在－80℃。在筛查先天性梅毒时，应检测母亲的血清而非脐带血。对于 IgM 特异性试验，由于脐带血样本可能会被母体血液污染，因此需要检测婴儿血清。

(二)齿垢密螺旋体(*T. denticola*)和其他口腔密螺旋体

在牙龈炎或牙周炎的常规临床管理中，通常不会采集样本用于检测、分离或鉴定齿垢密螺旋体（*T. denticola*）和其他共生密螺旋体。以研究为目的的培养方法已被详细发表[108]。

(三)短螺旋体(*Brachyspira*)：肠道螺旋体病

粪便样本或直肠拭子可用于菌株分离或 DF 显微镜检查。来自结肠或直肠的活检组织可用作培养、PCR、光镜或透射电镜组织学检查的材料。粪便样本应收集于无菌容器中，并在常温下运送至实验室进行培养或 DF 镜检。如果试验需在异地进行，则样本需放置在冰上连夜运送。直肠拭子可收集于 Stuart 培养基（Becton Dickinson，Sparks，MD）中运输。放置于生理盐水中的活检标本已成功用于阿尔堡短螺旋体（*B. aalborgi*）的培养[109]。用于培养的样本应快处理，一定要在样本收集后 24 h 内进行。用于组织学检查的活检样本应按照如下处理梅毒螺旋体的方法进行处理。分离到的螺旋体在－80℃下保存于含有 50%马血清和 10%甘油的脑心浸液肉汤中可存活 5 年或更长时间[2]。

六、直接检查

(一)梅毒螺旋体(*T. pallidum*)

1. DF 镜检 一期、二期和早期先天性梅毒的渗出性病灶标本可在任何可能的情况下用于 DF 镜检。其他的标本类型（如淋巴结抽吸物、羊水）可能含有足量的满足成功 DF 镜检的螺旋体。由于梅毒螺旋体（*T. pallidum*）不易与共生的口腔

螺旋体区分，DF 镜检不应用于口腔病灶样本的检测。DF 镜检可用于嘴唇病损的检查，但要小心排除唾液，且检查必须由训练有素的显微镜专家实施。

2. 直接荧光抗体梅毒螺旋体试验(DFA-TP)

基于直接荧光抗体梅毒螺旋体试验的免疫染色利用异硫氰酸荧光素偶联的多克隆或单克隆抗体在印片中检测梅毒螺旋体[42, 110]。由于其技术复杂、需要特殊仪器及抗体偶联物的有限可及性，该方法从未被广泛接受；最新的欧洲实验室指南则不建议使用免疫荧光染色诊断梅毒[111]。

3. 银染/IHC 长期以来，银染色(Warthin-Starry 或 Steiner 改进的 Dieterle 方法)一直被用来显示石蜡包埋标本中的密螺旋体。采用市售(Biocare Medical，Concord，CA；ViroStat)的多克隆抗梅毒螺旋体(*T. Pallidum*)抗体和生物素-亲和素免疫过氧化物酶对石蜡包埋的二期梅毒患者的皮肤活检组织进行染色已经得到了良好的 IHC 检测结果[112-113]。

4. PCR 尽管 PCR 没有常规应用于梅毒检测且没有 FDA 批准的商业化检测试剂，但自 1991 年以来已有大量的使用基于几个基因靶点的 PCR 检测梅毒螺旋体(*T. pallidum*)的研究报道[114-115]。其中，*polA* (*tp*0105)[116] 和 *tpn*47 (*tp*0574)[117] 最为常用。Quest Diagnostics 公司目前提供针对鞭毛生物合成蛋白(*flhB*)基因的实时荧光 PCR 试剂，用于脑脊液和生殖器病变拭子的检测。这项检测的分析敏感性为 100 个基因组拷贝/ml。PCR 在用于检测生殖器溃疡和其他渗出性病变标本时最为有效；这些标本通常含有大量密螺旋体且可以通过无创技术获得。在用拭子取样之前研磨二期梅毒的斑丘性病变可以产生足够的样本用于 PCR 检测[118]。

用于 PCR 的基因组 DNA 通常使用市售的 DNA 提取试剂盒(例如，QIAamp DNA mini kit；Qiagen Inc.，Valencia，CA)从 200μl 含有生殖器溃疡拭子的核酸运输培养基中提取。具有开展实时荧光 PCR 能力的实验室可采用美国 CDC 性病预防部参考与研究实验室所开发的基于 TaqMan 探针的多重 PCR。这种方法同时检测作为生殖器溃疡(genital ulcer disease，GUD)主要病原体的梅毒螺旋体、杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*)和单纯疱疹病毒(*herpes simplex viruses*)1 和 2(HSV-1 和-2)。检测所用的基因靶标、引物和探针如表 62-2 所示。不具备开展实时荧光 PCR 能力的实验室可采用 Mackay 等[119]描述的传统多重 PCR 来检测梅毒螺旋体、杜克雷嗜血杆菌和 HSV。如果无须检测杜克雷嗜血杆菌，多重反应的 PCR 产物可通过琼脂糖凝胶电泳进行分析。否则，必须使用酶联杂交试验[119]，因为杜克雷嗜血杆菌和 HSV 的扩增片段大小不能通过琼脂糖凝胶电泳进行区分。

当诊断的主要目的仅仅是为了确证标本中是否含有梅毒螺旋体时，可采用以 *polA* 基因为靶标的基于 TaqMan 技术的实时荧光 PCR[120]。该方法的分析敏感性在每次 PCR 反应检出 1～10 个基因组拷贝之间[121]。不能进行实时荧光 PCR 的实验室可以采用 Liu 等[122]描述的 PCR 条件，使用针对梅毒螺旋体 *polA* 基因的常规检测方法。该方法的检出限为 10 个生物。2 种 *polA* PCR 方法都能检测梅毒螺旋体的 3 个亚种，而不会对其他生物产生假阳性反应。实验室自建的 PCR 方法或“内部”分析方法在检测患者样本之前必须进行性能验证。

(二)短螺旋体(Brachyspira)

可采用 DF 镜检法检查新鲜粪便样本或直肠拭子中的螺旋体[123]。从血琼脂中培养出的螺旋体可用 Warthing-Starry 银染观察到，也可悬浮于生理盐水，采用 DF 显微术进行观察[2]。结肠和直肠活检标本则可采用过碘酸-雪夫染色(periodic acid-Schiff)、苏木素-伊红染色或银染进行检查：螺旋体在上皮细胞刷状缘显示为一层“绒毛状外壳”(图 62-2，顶部)[109, 124]。透射电镜显示其末端黏附于宿主细胞膜(图 62-2，底部)[125-126]。使用针对梅毒螺旋体(*T. pallidum*)、牛结核分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)和一种未定性的肠道螺旋体的多克隆抗体的 IHC 也已开展[124, 126]。可以用表 62-3[127-128]中描述的 PCR 方法检测多毛短螺旋体(*B. Pilosicoli*)和阿尔堡短螺体(*B. aalborgi*)的 DNA，或者，也可以用实时荧光 PCR 同时检测这 2 个物种及“人型短螺旋体(*B. hominis*)”[18]。

表 62-2 用于诊断生殖器溃疡性疾病的寡核苷酸引物和探针

生物体或质控	靶基因	引物/探针的序列 (5′-3′)	核苷酸位置	浓度[a](nM)
HSV-1 和-2	*gD*[b]	CCCCGCTGGAACTACTATGACA	472～493	200
		GCATCAGGAACCCCAGGTTA	535～516	300
		FAM[f]-TTTAGCGCCGTCAGCGAGG-BHQ[g]	496～514	200
杜克雷嗜血杆菌(*H. ducreyi*)	*hhdA*[c]	AATCGTTAACTGCGGGATTAGG	5153～5174	200
		CAATAGACACATTATCGCCCTTTAAA	5245～5220	300
		JOE[f]-ATGGCCATGGTAGTGAGGTAAATCAGGCT-GT-BHQ	5180～5210	200
梅毒螺旋体(*T. pallidum*)	*tpn47*[d]	CAACACGGTCCGCTACGACTA	864～884	300
		TGCCATAACTCGCCATCAGA	931～912	300
		ROX[f]-ACGGTGATGACGCGAGCTACACCA-BHQ	887～910	200
人类	*RPP30*[e]	CCAAGTGTGAGGGCTGAAAAG	826～846	80
		TGTTGTGGCTGATGAACTATAAAAGG	905～880	80
		CY5[f]-CCCCAGTCTCTGTCAGCACTCCCTTC-BHQ	851～876	80

注：[a] 显示多重反应体系中引物和探针的最终浓度；[b] 糖蛋白 *D* 基因；[c] 溶血素 *A* 基因；[d] 47-kDa 脂蛋白(*Tpp47*)基因；[e] 人类核糖核酸酶 *P* 基因靶标作为内部质控；[f] 荧光染料；[g] 荧光淬灭剂(Black hole quencher)

表 62-3 阿尔堡短螺体(*B. aalborgi*)和多毛短螺旋体(*B. pilosicoli*)特异性 PCR 的引物和热循环条件[a]

微生物	引物序列(名称) (5′-3′)	预期产物大小(bp)	热循环条件
阿尔堡短螺体 16S rRNA	TAC CGC ATA TAC TCT TGA C(F, Ba 16S) CCT ACA ATA TCC AAG AAC C(R, Ba 16S)	471	94℃ 4.5 min; 94℃ 30 s, 46℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 33 个循环
阿尔堡短螺体 *nox*	GGT TGA CTC AAG CAC TAC(F, Ba *nox*) AAA CCG TAT TTT GTT CCA GG(R, Ba *nox*)	334	94℃ 4.5 min; 94℃ 30 s, 46℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 30 个循环
多毛短螺旋体 16SrRNA	AGA GGA AAG TTT TTT CGC TTC(Acoli 1) CCC CTA CAA TAT CCA AGA CT	439	94℃ 4.5 min; 94℃ 30 s, 51℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 33 个循环
多毛短螺旋体 *nox*	GTA ACT CCT CCT ATT GAG(F, Sp *nox*) GCA CCA TTA GGT AAA GTC(R, Sp *nox*)	465	94℃ 4.5 min; 94℃ 30 s, 45℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 30 个循环

注：[a] 改编自参考文献[127]和[128]

七、分离方法

(一)苍白螺旋体(*T. pallidum*)

RIT 是从临床标本中分离梅毒螺旋体(*T. Pallidum*)的唯一方法。因为具有非常高的敏感性(1～2 个生物体)，RIT 长期以来一直被认为是检测密螺旋体的“金标准”[30]。该方法已由 Lukehart 等[27]详细描述。由于诸多因素，包括在其他检测可用时将动物用于生物医学目的的伦理考虑、成本、对专门动物设施的要求、对训练有素的人员的需要，以及兔子检测呈阳性所需的时间，RIT 对于常规诊断目的不切实际。

(二)短螺旋体(*Brachyspira*)

标本可在含 5%～10%的去纤羊或牛血和抗菌药物(通常为 400 μg/ml 的大观霉素和 25 μg/ml 的黏菌素和 25 μg/ml 的万古霉素)的脑心浸液琼脂或胰蛋白酶大豆琼脂选择性培养基上，于 37℃ 厌氧条件下培养(理想温度为 41℃，以促进生长)[2]。螺旋体形成一个融合生长，边缘清晰的低平光泽，周围有弱溶血区，可通过 DF 或带湿垫的相差显微镜进行确认。阿尔堡短螺旋体(*B. Aalborgi*)的培养期通常较长。培养 21 天后，阿尔堡短螺旋体在脑心浸液琼脂培养基上呈现出直径为 1.2 mm、浅灰色、微弱 β-溶血型的菌落[129]。多毛螺旋体可在血

琼脂平板上继代培养，并在含有 10% 胎牛血清的无氧脑心浸液中进一步繁殖。阿尔堡短螺旋体已成功地在脑心浸液琼脂上进行了继代培养[129]，并可在含有 10% 胎牛血清的胰蛋白酶大豆肉汤中增殖[109]。如果怀疑有螺旋体血症，应将血样培养在厌氧血培养瓶中[2]。由于生长不能自动检测，应目视检查培养基的浑浊度并用 DF 或相差显微镜对抽取样本进行检查。

八、鉴定

短螺旋体(*Brachyspira*)

鉴于先前用于区分弱溶血性肠道螺旋体的试验的可靠性值得怀疑，诊断实验室不再对肠道螺旋体的生化表征进行检测[2]。近年来，基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱已被应用于短螺旋菌的快速鉴定，且价格低廉[130]。

九、分型系统

(一)梅毒螺旋体(*T. pallidum*)

梅毒螺旋体基因组中稳定多态性的鉴定使得建立一种实用的梅毒螺旋体分子分型系统成为可能[131]。分型基于对 *tpr* 基因的 3 个家族成员[*tprE* (*tp*0313)、*tprG* (*tp*0317)和 *tprJ* (*tp*0621)]的 PCR 扩增和限制性片段长度多态性(RFLP)分析 (图 62-4*，顶部)，以及对 *arp*(*tp*0433)内可变数量的 60 bp 长的串联重复序列的扩增(图 62-4*，底部)[132]。菌株分型的主要样本类型为生殖器溃疡和黏膜病变组织，但也可使用其他来源的标本[133-134]。目前，已鉴定的主要毒株型别为 14a、14d 和 14f[132-134]。来自流行病学相关病例的标本中只有少数标本进行了分型[135]。一种改进的分型方法业已报道，其利用上述 *arp*/*tpr* 方法(CDC 分型系统)，以及对 *tp*0548 基因的 84bp 可变区的序列分析，使各菌株之间得以更好地区分[136]。

(二)短螺旋体(*Brachyspira*)

多毛短螺旋体(*B. pilosicoli*)菌株具有多样性特点[2]，已经通过脉冲场凝胶电泳[137]、多位点酶电泳[138]和可变数目串联重复分析[139]进行了特征分析。目前还没有关于阿尔堡短螺体(*B. aalborgi*)菌株分型的报道。

十、血清学试验

(一)一般原理

梅毒可引起 2 种不同类型的抗体反应，传统上被称为"非密螺旋体"和"密螺旋体"抗体反应(图 62-3)[42]。检测针对类脂抗原的抗体的非密螺旋体试验最早被开发出来，如沃瑟曼反应(Wasserman reaction，一种补体结合试验)[140]。非密螺旋体试验仍用于梅毒的筛查和治疗后血清学反应的评估(表 62-4)。然而，非密螺旋体试验有 2 个固有缺陷：①对一期和晚期梅毒缺乏敏感性(图 62-3)；②缺乏特异性，因为与梅毒无关的疾病和情况可诱发反应性抗体的产生，导致生物学假阳性结果(biological false positives，BFPs)[141]。因此，起始于荧光密螺旋体抗体吸附试验(fluorescent treponemal antibody absorption，FTA-ABS)的传统密螺旋体试验被开发用作确证试验。这些确证试验通过使用梅毒螺旋体(*T. pallidum*)或其裂解物来解决非密螺旋体试验缺乏特异性的问题(表 62-5)[42]。然而，在过去的几十年里，由于大型实验室对高通量检测的需要，新的自动化 EIA、免疫印迹和化学发光分析技术的开发及它们作为密螺旋体特异性筛查试验的使用均出现了激增(见下文表 62-6，表 62-7，表 62-9 和表 62-10)。在资源贫乏的国家，快速梅毒试验的开发满足了临床对能够快速产生结果，且操作简单、价格低廉的方法的需求。最初的快速梅毒试验只检测出密螺旋抗体，但现在的几种快速试验具有双重平台，除提供密螺旋体抗体检测外，还可以提供非密螺旋体抗体或艾滋病病毒抗体检测[142-144]。

(二)非密螺旋体试验

表 62-4 显示了非密螺旋体抗体试验的主要特征。这些试验使用明确含量和比例的心磷脂、卵磷脂和胆固醇的组合，它们在与 IgM 和 IgG 型抗体反应时出现絮状凝集。在美国公共卫生协会出版的"梅毒检测手册"中，可以找到 RPR、VDRL 和 TRUST 的详细检测方案(http://www.apha.org)[145]。

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

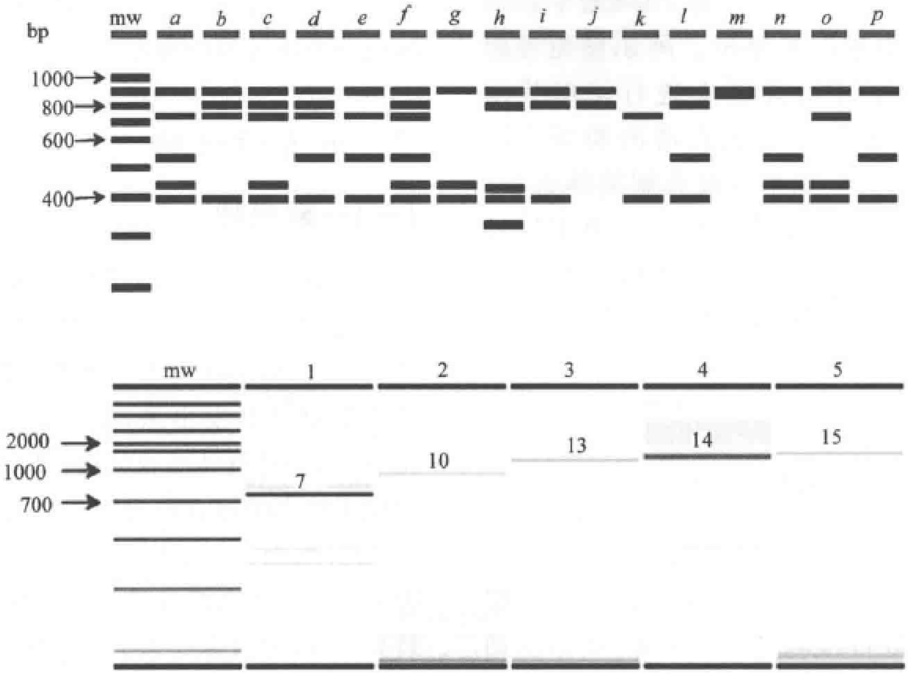


图 62-4 PCR-based molecular typing of *T. pallidum* "street strains." (Top) Schematic representation of all *tpr* gene MseI RFLP patterns identified to date. Reproduced from reference 229 with permission from Springer New York, NY, USA. (Bottom) Schematic showing different *arp* repeat sizes obtained by PCR. Molecular weight markers in base pairs (bp) are shown to the left in each panel. In the bottom panel, the size of each repeat is indicated above the amplicon

表 62-4 非密螺旋体抗体检测试验[a]

读取数据	试验		
	VDRL	RPR	TRUST
指标参数	絮凝	絮凝	絮凝
标本类型	S,C	S,P	S,P
样本量(μl)	50～100	50～100	50～100
反应时间(min)	15	15	15
FDA 批准	是	是	是
敏感性(%)			
一期	67～78	60～86	70～85
二期	96～100	100	100
三期	85～95	98	98
特异性	96～99	93～99	98～99
参考文献	42,173,201,230	42,145,150,173	42,145

注：[a] S. 血清；C. CSF；P. 血浆

表 62-5　传统密螺旋体抗体试验

特征	试验			
	FTA-ABS	MHA-TP	TPHA	TP-PA
检测方法类型	间接免疫荧光	凝集	凝集	凝集
检测抗体类型	IgG + IgM	IgG + IgM	IgG + IgM	IgG + IgM
用于捕获抗体的成分	全部的 Tp 抗原	Tp 抗原	Tp 抗原	Tp 裂解物
偶联物	抗人 Ig-FITC	无	无	无
标本类型[a]	S,C	S	S	S
标本量(μl)	50	100	10	100
反应时间(h)	1.5	2	1.5	2
FDA 认可	是	是	是	是
敏感性(%)				
一期梅毒	82～90	57～88	86	85～97.5
二期梅毒	100	96～100	100	100
潜伏期梅毒	96	96～97	100	100
三期梅毒	100	98～100	100	96.2～100
特异性(%)	94.5～98.6	99	100	97.6～100
参考文献	42,204,231	232,233	234	149,150,173,204

注：[a]C. CSF；S. 血清；Tp. 梅毒螺旋体(*T. pallidum*)

VDRL 试验是一种在特殊玻片上进行的定量絮凝反应[145]。在放大倍数为×100 的显微镜下读取结果，以引起絮凝的最高效价为终点。RPR 卡片试验检测血清/血浆样本，以细小的木炭颗粒作为指示剂[145]。开展 RPR 卡片试验时，首先将连续稀释的血清或血浆（加热或未加热）制备在塑料涂敷的卡片上，然后加入 RPR 抗原。抗体的存在会引起絮凝，而没有抗体的悬浮液会保持均匀的灰色。TRUST 是一种肉眼可见的凝集试验，与 RPR 非常类似，只是其中的细炭颗粒被甲苯胺红所替代[145]。TRUST 的敏感性与 RPR 相近(见表 62-6)，但特异性略高[42]。最近，使用乳胶凝集或免疫分析的自动化 RPR 试验已经被开发出来，以增加大样本检测的能力，并将人与人之间的差异降至最低[146-147]。然而，自动化的 RPR 试验检测结果间存在差异，包括总体的检测敏感性较标准 RPR 偏低[146]。

VDRL 试验还可用于 CSF 检测，用以鉴定神经性梅毒。CSF-VDRL 的操作方法与血清 VDRL 相同，只是 VDRL 抗原需采用 10%的盐水作 1∶1 稀释。CSF-RPR 检测可用于诊断有症状的神经梅毒，但敏感性仅为 58%，而 CSF-VDRL 的敏感性为 67%[148]。

(三)密螺旋体试验

表 62-5 至表 62-10 总结了各种密螺旋体抗体试验的主要特征，其中包括 FDA 批准的试验，以及许多其他全球商品化试验或根据欧洲标准批准的试验。有关 FTA-ABS、梅毒螺旋体微量血凝试验(microhemagglutination assay-T. pallidum，MHA-TP)、梅毒螺旋体颗粒凝集试验(T. pallidum particle agglutination assay，TP-PA)和一些最初的密螺旋体 EIAs 的详细检测方法可在《梅毒检测手册》(*Manual of Tests for Syphilis*)中可找到[145]。

1. FTA-ABS 试验(表 62-5)　在 FTA-ABS 试验中，首先用蚀疮溃疡密螺旋体(*T. phagedenis*) Reiter 株提取物（吸附剂）吸附血清样本以去除天然存在的交叉反应抗体，继而与固定在玻片上的密螺旋体反应；异硫氰酸荧光素偶联的抗人免疫球蛋白则用于显示抗体标记的生物体。由于所用偶联物的天然特性，FTA-ABS 试验不能区分 IgG 或 IgM 型抗体，其依据荧光强度高低对血清中抗体进行主观评分。FTA-ABS 试验还可用于不加热 CSF 的检测，用以诊断神经性梅毒(见下文)。由于结果的判读存在主观性，且需要昂贵的显微镜设备，FTA-ABS 试验在临床实践中很少使用。

表 62-6 密螺旋体 IgM 和 IgG 型抗体的酶联免疫试验[a]

特征	试验						
	Captia Syphilis-M	Mercia Syphilis IgM	Treponema pallidum μ-cap-ture IgM ELISA	recomWell Treponema IgM	Pathozyme Syphilis-M Capture	Captia Syphilis-G	Enzywell Syphilis IgG
制造商	Trinity Biotech, Bray Ireland	Microgen Bioproducts Ltd., Camberly, UK	IBL International, Hamburg, Germany	Mikrogen Diagnostik	Omega Diagnostics, Alva, Scotland	Trinity Biotech, Bray, Ireland	Disease Diagnostica, Siena, Italy
检测方法类型	抗体类捕获法	抗体类捕获法	抗体类捕获法	两步夹心法	间接夹心法	两步夹心法	两步夹心法
检测抗体类型	IgM	IgM	IgM	IgM	IgM	IgG	IgG
用于捕获抗体的成分	羊抗人 IgM	兔抗人 IgM	兔抗人 IgM	Tp-15、-17 和-47	Tp-15、-17、-44 和-47	完整 Tp 抗原	rTp 抗原
偶联物	Tp 抗原-HRP	Tp 抗原-HRP	Tp 抗原-HRP	rTp 抗原-HRP	抗Tp 抗体-HRP	抗人 IgG-HRP	NS
标本类型	S	S	S, P	S, P	S	S, P	S
标本量(μl)	20	NS	10	10	25	50	10
反应时间	3 h	3 h	3 h	NS	NS	2 h, 20 min	2 h, 25 min
FDA 认证	是	否	否	否	否	是	是
敏感性(%)							
一期梅毒	94	90	NS	50.8	89.8	83～95	
二期梅毒	85	100	NS	80.3	90.9	23	
潜伏梅毒	82	75	NS	48.0	84.0	76.5	
敏感性，阶段未明确(%)			97.4	100		94.7～97.7	96.3
特异性(%)	100	NS	99～100	98～100	96.0	94.2～100	94.6
参考标准	19S-IgM FTA-ABS	TP-PA	19S-IgM FTA-ABS	WB	TP-PA	TPHA/TP-PA	TP-PA
参考文献	235	235,236	产品说明书	产品说明书;236,237	237	203,235,238	239

注：[a] rTp. 重组梅毒螺旋体抗原(recombinant *T. pallidum* antigen)；HRP. 辣根过氧化物酶；S. 血清；P. 血浆；NS. 未说明；Tp. 梅毒螺旋体(*T. pallidum*)

表 62-7　联合检测密螺旋体 IgM/IgG 型抗体的酶联免疫试验[a]

特征	试验									
	Bioelisa Syphilis 3.0	Enzygnost Syphilis	Enzywell Syphilis Screen	Mercia Syphilis Total	ICE Syphilis	Syphilis EIA Ⅱ	Pathozyme Syphilis	Syphilis Total Antibody	Trepanostika Tp Recombinant	Trep-Sure
制造商	Biokit, Barcelona, Spain	Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY	Diesse Diagnostica, Siena, Italy	Microgen Bioproducts	Murex Biotech, Dartford, UK	Newmarket Laboratories, Kentford, UK	Omega Diagnostics, Alva, Scotland	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA	bioMérieux, Marcy L'Étoile, France	Trinity Biotech, Bray, Ireland
检测方法类型	两步夹心法	竞争法	一步夹心法	竞争法	两步夹心法	一步夹心法	竞争法	两步夹心法	一步夹心法	两步夹心法
检测抗体类型	IgG + IgM	IgG + IgM	IgG + IgM	IgG + IgM	IgG + IgM	IgG + IgM	IgG + IgM	IgG + IgM	IgG + IgM	IgG + IgM
用于捕获抗体的成分	rTp-15、-17 和-47	Tp 抗原	rTp 抗原	Tp 抗原	rTp-15、-17 和-47	rTp-15、-17 和-47	Tp 抗原	rTp-15、-17 和-47	rTp 抗原	rTp 抗原
偶联物	rTp-15、-17 和-47;HRP	抗 Tp 抗体-HRP	rTp 抗原-HRP	抗 Tp 抗体-HRP	rTp 抗原-HRP	rTp-15、-17 和-47;HRP	抗 Tp 抗体-HRP	rTp-15、-17 和-47;HRP	rTp 抗原-HRP	rTp 抗原-HRP
标本类型	S, P	S	S,P	S,P	S	S,P	S,P	NS	S,P	S,P
标本量(μl)	50	25	30	25	50	50	25	50	30	100
反应时间	2 h,20 min	2 h,40 min	1 h,20 min	2 h,25 min	2 h,50 min	1 h,40 min	2 h,25 min	2 h,20 min	2 h,10 min	2 h
FDA 认可	否	否	否	否	否	否	否	是	否	是
敏感性(%)										
一期梅毒	98.2	98.2	98.2		75～98.2	99.1	97.4		99.1	
一期梅毒，MHA-TP 阴性	67.3	69.2			75.0		69		76.9	
二期梅毒	100	100	100		100	100	100		100	
潜伏期梅毒	100	100	100		100	100	100		100	
三期梅毒										
敏感性，阶段未明确(%)	98.2	98.2	98.2	96.5	98.2	99.1	97.4	97.4	99.1	96.9～100
特异性(%)	100	100	100	100	99.2	100	98.5～100	100	100	94.7～99.9
参考标准	TPHA/TP-PA	TPHA/TP-PA	TPHA/TP-PA	TPHA/TP-PA	TPHA/TP-PA	TPHA/TP-PA	TPHA/TP-PA	TPHA/TP-PA	TPHA/TP-PA	FTA-ABS/TP-PA
参考文献	203,231	185,203,231	203,231	203	203,231	203	203,231	203	203,231	204,239

注：[a] rTp. 重组梅毒螺旋体抗原(recombinant *T. pallidum* antigen)；HRP. 辣根过氧化物酶；S. 血清；P. 血浆；NS. 未说明；Tp. 梅毒螺旋体(*T. pallidum*)

表 62-8 包括双平台分析的快速梅毒试验(密螺旋体抗体加非密螺旋体抗体或 HIV 抗体检测)[a]

特征	试验						
	Determine Syphilis TP	Syphilis Health Check	SD Bioline HIV/Syphilis Duo	INSTI HIV/Syphilis Multplex Assay	Multiplo Tp/HIV	Onsite HIV/Syphilis Ab Combo Rapid Test	DPP Syphilis Screen and Confirm
制造商	Alere Inc, Waltham, MA	Trinity Biotech, Bray, Ireland	Alere Inc., Waltham, MA	BioLytical Laboratory, Richmond, Canada	Medmira Inc., Halifax, Nova Scotia	CTK Biotech, San Diego, CA	ChemBio Diagnostic Systems, Inc., Medford, NY
检测方法类型	免疫层析法	免疫层析法	固相免疫层析法	向下流动免疫分析	垂直流动免疫分析	水平流动免疫层析法	固相免疫层析法
检测抗体类型	IgG + IgM	IgG + IgM	IgG + IgM+ IgA	IgG	IgG + IgM	IgG + IgM+ IgA	IgG + IgM
用于捕获抗体的成分	rTp-47	rTp	rTp-17	NS	rTp-15,-17,-47	rTp	rTp,心磷脂
偶联物	抗人 IgG-金	抗人 IgG-金	抗人 IgG-金	抗人 IgG-金	抗人 IgG-金	抗人 IgG-金	抗人 IgG-金
标本类型	S,P,B	S,P,B	S,P,B	S,P,B	S,P,B	S,P,B	S,P,B
标本量(μl)	50	25~50	10	50	10	20	10
反应时间	15 min	10 min	20 min	60 s	3 min	15~20 min	15~20 min
FDA 认可	否	是	否	否	否	否	否
敏感性,密螺旋体(%)	97.3	71.4~89.8	69.7	87.4	94.6	92.5	89.3~96.7
特异性,密螺旋体(%)	96.4	91.5~92.3	99.7	97.0	92.8	97.0	98.5~99.6
参考标准	TPHA/TP-PA	EIA/TPHA	TP-PA	TP-PA	TP-PA	密螺旋体免疫试验	TRUST/TP-PA/密螺旋体免疫试验
参考文献	142	218,240	241	242	144	142	142,158

注:[a] rTp. 重组梅毒螺旋体抗原(recombinant *T. pallidum* antigen);S. 血清;P. 血浆;B. 血;NS. 未说明;Tp. 梅毒螺旋体(*T. pallidum*)

2. MHA-TP、TPHA 和 TP-PA 试验(表 62-5) MHA-TP 试验是一种使用梅毒螺旋体(*T. pallidum*)抗原致敏、甲醛处理的鞣化绵羊红细胞的被动血凝试验;梅毒螺旋体血凝试验(T. pallidum hemaagglutination,TPHA)则采用禽类红细胞。当前,MHA-TP 和 TPHA 已被 TP-PA 所取代。TP-PA 被认为操作更容易,并且与 FTA-ABS 具有相当的敏感性[149]。TP-PA 试验(Fujirebio Inc., Tokyo,Japan)是 MHA-TP 的一种改良试验,其采用梅毒螺旋体致敏的明胶颗粒来减少非特异性交叉反应的数量[150]。在这 3 种试验中,发生凝集反应表明存在 IgG 和(或)IgM 型抗密螺旋体抗体。CSF TP-PA 作为神经梅毒的一种诊断方法正在被进一步的研究(见下文)。

3. EIAs(表 62-6 和表 62-7) 20 世纪 80 年代以来,已有许多 EIAs 被开发应用于梅毒的诊断,其中大部分试验采用梅毒螺旋体(T. pallidum)的重组抗原来检测 IgM 和(或)IgG 型抗体。其中 15、17、44.5 和 47kDa 的脂蛋白抗原最为常用,因为它们能诱导产生强大而持久的抗体反应[151],并且被认为仅由致病性密螺旋体所表达[152]。尽管使用重组抗原的 EIAs 的检测性能预期优于使用梅毒螺旋体裂解物的梅毒诊断试验,但这一理论尚未得到证实[154-156]。

表 62-9 密螺旋体免疫印迹试验[a]

特征	试验		
	MarDx T. pallidum MarBlot	Treponema＋VDRL ViraBlot	INNO-LIA Syphilis Score
制造商	Trinity Biotech, Bray, Ireland	ViraMed Biotech, Planegg, Germany	Innogenetics NV, Ghent, Belgium
检测方法类型	WB	伪-WB	伪-WB
检测抗体类型	IgG＋IgM	IgG＋IgM	IgG ＋ IgM
用于捕获抗体的成分	全部 Tp 抗原	rTp-15、-17、-44.5 和-47	rTp-15、-17、和-47
偶联物	抗人 Ig-AlkP	抗人 Ig-AlkP	抗人 Ig-AlkP
标本类型	S	S	S
标本量(μl)	20	20	10
反应时间	1 h 40 min	1.5 h	4～6 h
FDA 认可	否	否	否
敏感性(%)			
一期梅毒	71.8		92.3～94.1
二期梅毒	90		100
潜伏期梅毒	72.5		94.4
三期梅毒	NS		100
敏感性,阶段未明确(%)	65.2	93.8～95.5	94.1
特异性(%)	100	97.8～98.5	99.3～100
参考标准	TP-PA/FTA-ABS	TP-PA/FTA-ABS	TP-PA/FTA-ABS
参考文献	产品说明书;162, 200	产品说明书;204, 243	162, 200, 201, 244

注:[a] rTp. 重组梅毒螺旋体抗原(recombinant *T. pallidum* antigen);WB. 蛋白质印迹法(Western blot);S. 血清;AlkP. 碱性磷酸酶;Tp. 梅毒螺旋体(*T. pallidum*)

表 62-10 密螺旋体化学免疫分析和多重流式免疫分析[a]

特征	试验					
	Architect Syphilis TP	Immulite 2000 Syphilis Screen	Liaison Treponema	Elecsys Syphilis	AtheNA Multi-Lyte	BioPlex 2200 Syphilis
制造商	Abbott Laboratories, Abbott Park, IL	Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL	Diasorin S. p. A, Vercelli, Italy	Roche Diagnostics, Mannhein, Germany	Zeus Scientific, Branchburg, NJ	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
检测方法类型	微珠捕获法	微珠捕获法	微珠捕获法		微珠捕获法	微珠捕获法
检测抗体类型	IgG + IgM	IgG + IgM	IgG + IgM	IgG + IgM	IgG	IgG + IgM
用于捕获抗体的成分	rTp-15、-17 和-47	rTp-17	rTp-17	rTp-15、-17 和-47	rTp-17	rTp-15、-17 和-47
偶联物	抗人 Ig-吖啶	抗人 Ig-AlkP	异鲁米诺-抗原结合物	链霉亲和素包被的微粒	抗人藻红蛋白	抗人藻红蛋白
标本类型	S, P	S, P	S	S	S	S
标本量 (μl)	30～150	100	70	10	10	5
反应时间(min)	30	35	40	18	75	45
FDA 认可	是	是	是	是	是	是
敏感性 (%)						
一期梅毒	97.5		100.0	100.0	90.5	91.40
二期梅毒	100		100.0	100.0	100	89.3
潜伏期梅毒				99.4～100	86.5	100
三期梅毒	100		98.7			86.4
敏感性，阶段未明确 (%)	99.5	96.4～99.7	100	98.4～99.8	94.3	96.9～100
特异性 (%)	99.7	100	99.7	99.5～100	98.1	98.2～99.4
参考标准	FTA-ABS, TP-PA, Liaison	TP-PA, Liaison	TPHA, WB, TP-PA, Liaison	TP-PA, Liaison	TP-PA	RPR, TP-PA, FTA-ABS, EIA
参考文献	产品说明书;245, 246	产品说明书;246	产品说明书;232, 246	246, 247	产品说明书;CDC,未发表的数据	产品说明书;CDC 未发表的数据;204, 248

注:[a] rTp. 重组梅毒螺旋体抗原(recombinant *T. pallidum* antigen); S. 血清; P. 血浆; Tp. 梅毒螺旋体(*T. pallidum*)

EIAs 采用几种不同的检测原理，包括：①抗体类捕获；②夹心捕获；③竞争性反应。最初的一些专门检测密螺旋体 IgM 的 EIAs（表 62-5）基于抗体类捕获技术原理，采用山羊或兔抗人抗体和过氧化物酶（偶联物）共价标记的纯化梅毒螺旋体抗原与患者的抗密螺旋体抗体结合。如 Mercia Syphilis IgM 和 T. pallidum μ-capture IgM ELISA。两步夹心法 EIAs 使用固化的全部的或重组的梅毒螺旋体抗原来包被微孔板的板孔。患者血清或血浆标本在微孔中孵育，抗密螺旋体抗体被微孔中的抗原捕获。洗去未结合部分后，加入含辣根过氧化物酶标记的抗原偶联物，后者被结合于微孔板的抗密螺旋体抗体所捕获。未被捕获的偶联物随后被洗去，被捕获的偶联物通过与底物反应而被检测到。两步夹心法 EIAs 的示例包括 Trep-Sure 和 ICE Syphilis。一步夹心法 EIAs 与两步夹心法 EIAs 的原理相似，不同之处在于在一步夹心法 EIAs 中标本和偶联物被同时加入。一步夹心法 EIAs 的示例包括 Enzywell Syphilis Screen 和 Syphilis EIA II。采用抗原-抗体偶联物的 EIAs 的一个缺点是背景信号高，易产生假阳性结果。增高的信号提示更强的血清学反应，并与患者血清中存在的抗密螺旋体抗体的量成比例。

竞争法 EIAs，如 Pathozyme Syphilis、Enzygost Syphilis，使用固化的抗原来捕获患者血清中特异的 IgG 和 IgM 抗体，进而阻碍具有相同特异性的抗体偶联物的结合。在竞争法 EIAs 中，光密度与结合的抗体量成反比。

4. 快速梅毒试验（表 62-8） 大多数梅毒快速试验为免疫层析试纸条试验，检测手指血、血清或血浆中的密螺旋体抗体（表 62-10）。所有的快速梅毒试验均采用重组梅毒螺旋体抗原来检测 IgM 和 IgG 抗体，通常在 25 min 内提供结果。最近一项针对全球使用的快速梅毒试验的荟萃分析报告称，它们的总体敏感性和特异性与实验室自建的密螺旋体试验相当[107]。然而，阳性结果需要后续的非密螺旋体抗体试验作进一步评估。

ChemBio Dual Path Platform Screen and Confirm 是一种能同时提供密螺旋体和非密螺旋体定性检测的快速试验[157-158]。该装置包含两个相互垂直放置的硝化纤维素膜条，允许测试样品和检测偶联试剂独立输送[157]。几种采用重组或合成的 HIV-1 和 HIV-2 抗原的快速试验目前已将密螺旋体抗体和 HIV 抗体检测整合到同一平台上（表 62-8）[159]。这些双重快速试验对于资源贫乏医疗环境中的产前筛查非常有利[160-161]。

5. 免疫印迹试验（表 62-9） 免疫印迹技术能鉴定被血清抗体所识别的特异性密螺旋体蛋白，因而具有很高的特异性。当使用合适的抗免疫球蛋白抗体偶联物时，它们还可单独检测 IgG 或 IgM 型抗体。蛋白印迹（western blot，WB）技术使用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离梅毒螺旋体（*T. pallidum*）抗原，继而将其转移至硝化纤维薄膜，并与病人血清反应。MarDx 试验（Trinity Biotech，Bray，Ireland）使用全部的梅毒螺旋体裂解物，用于验证筛查与确诊密螺旋体试验结果不一致时的血清反应性[162]。INNO-LIA 和 ViraBlot 试验为伪 WBs（Pseudo-WBs），它们将 4 种重组抗原（15、17、44.5 和 47 kDa）结合于硝酸纤维素膜上。除了与 INNO-LIA 试验相同的 4 种重组抗原外，ViraBlot 试条（IgG 或 IgM）还有五个条带，其中的 VDRL 抗原量逐渐增加，因而可提供半定量的非密螺旋体检测结果。

6. 化学发光免疫分析（表 62-10） 自动化学发光免疫分析可在随机存取分析仪上进行，周转时间＜1h。重组梅毒螺旋体（*T. pallidum*）抗原被用来包被顺磁磁珠和连接于碱性磷酸酶或异鲁米诺衍生物的抗原偶联物。在与患者标本孵育一段时间后，洗去未结合的抗体偶联物，加入化学发光底物，其产生与结合偶联物成比例的光信号。自动化学发光免疫分析的例子包括 Architect Syphilis TP 和 Liaison Treponema Screen assay。

7. 多重流式免疫分析及其他新技术（表 62-10） 多重流式免疫分析基于 Luminex 荧光微珠技术。该试验在 96 孔微孔板中进行，具有高通量的特点。Luminex 分析在 2 个方面与 EIAs 不同：①捕获抗体附着在悬浮的聚苯乙烯珠子上而非微孔上；②采用不同强度的荧光基团对聚苯乙烯珠子进行染色，赋予每个小球一个独特的指纹，从而能够进行多重抗体检测。经夹心法免疫分析后，采用双激光流式细胞检测系统分析荧光珠子悬浮液。已开发的多重流式免疫分析方法包括 BioPlex 2200 Syphilis 和 AtheNA Multi-Lyte。

十一、抗菌药物敏感性

(一)梅毒螺旋体(*T. pallidum*)

由于缺乏体外培养体系,不可能常规开展梅毒螺旋体的抗菌药物敏感性试验。梅毒螺旋体菌株对青霉素G高度敏感,青霉素G在过去的65年里已经成功用于梅毒治疗[104]。体外试验证实头孢曲松对梅毒螺旋体具有很好的抗菌活性,当给予足够剂量时能有效治疗早期梅毒[104]。由于有关头孢曲松疗效的数据有限,建议仅在成熟的治疗方案存在禁忌时作为梅毒的替代疗法[104]。长期以来,四环素类药物一直被推荐用作治疗青霉素过敏的非怀孕的梅毒患者的二线药物,并有良好的记录;多西环素疗效优于四环素,因为其具有更长的半衰期和更好的神经系统渗透力[104]。与哺乳动物细胞共培养的研究表明,喹诺酮类药物对梅毒螺旋体的抗菌活性欠佳[34]。人们曾热衷于采用口服单剂2g阿奇霉素的方案治疗梅毒,但这种热情因发现地域分布广泛的耐大环内酯类药物的梅毒螺旋体菌株而有所减弱。这种耐药性与该细菌23S rRNA基因两个拷贝中的*A2058G*或*A2059G*突变有关[163]。最近报道了一种基于TaqMan的实时三重PCR检测方法,用于快速检测这两个点突变[158,164]。

(二)口腔密螺旋体(*Oral treponemes*)

抗菌治疗可作为牙周炎治疗的重要辅助手段。最近的一项研究报道,所有的齿垢密螺旋体(*T. denticola*)、索氏密螺旋体(*T. socranskii*)和文氏密螺旋体(*T. vincentii*)菌株对多西环素、米诺环素、阿奇霉素和红霉素敏感,但对喹诺酮类药物的敏感性各不相同[165]。

(三)短螺旋体(*Brachyspira*)

已采用琼脂稀释法对来自多地的多毛短螺旋体(*B. pilosicoli*)分离株进行了体外药敏试验[166]。这些分离株对阿莫西林/克拉维酸、头孢曲松、氯霉素、美罗培南、四环素和甲硝唑敏感。产β-内酰胺酶的耐药菌株已有报道[167-168]。甲硝唑仍然是治疗多毛短螺旋体感染的首选药物,目前尚无甲硝唑耐药的报道[2,169-170]。

十二、结果的评价、解释和报告

(一)梅毒螺旋体的直接检测

1. DF镜检和免疫荧光染色 在DF显微镜下观测到单个运动的梅毒螺旋体即可确诊梅毒。但DF镜检的预测价值则难以确定[171],一项研究声称,在临床诊断为一期梅毒的患者中,其阳性率为97%(80%患者首诊时即为阳性)[106]。PCR的出现为评估DF镜检的敏感性和特异性提供了急需的标准。一项比较DF镜检和常规多重PCR用于评估生殖器溃疡病因的研究发现,DF镜检的敏感性和特异性分别为81%和100%[117,172]。由于需要专门的显微镜和熟练掌握该试验的训练有素的实验室人员,使用DF镜检的实验室越来越少。然而,有研究表明,20%~34%的DF阳性的一期梅毒患者缺乏可检测的抗体(图62-3)[42,173],这凸显了对熟练掌握DF镜检术的持续需求。虽然免疫荧光染色至少与DF镜检法一样灵敏,而且更特异[42],但它从未被广泛接受,也不太可能在PCR时代看到更多的使用。

2. 梅毒螺旋体在组织中的检测 银浸染是检测福尔马林固定组织中梅毒螺旋体的传统方法[174],当常规组织病理学结果提示梅毒感染时应采用此法作进一步确诊。如果实验由最先进的实验室开展,且血清学试验具有反应性时,通过银染观察到螺旋体可被认为是梅毒感染的确切证据。值得注意的是,极少数罹患二期梅毒的HIV感染者表现为血清学反应阴性,银染法有助于明确诊断[175-176]。然而,银染法也存在一些缺点:容易出现染色伪影、敏感性有限且结果不易判断、对梅毒螺旋体不特异。经Steiner改良的Dieterle染色据说比Warthin-Starry染色更灵敏[177]。使用商品化多克隆抗体的IHC在很大程度上避免了银染法的局限性,但必须牢记的是,这些免疫试剂也可与梅毒螺旋体以外的其他螺旋体[如伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)]发生交叉反应。

3. 梅毒螺旋体(*T. Pallidum*)的PCR检测 与DF镜检相比,PCR提高了生殖器溃疡渗出物中梅毒螺旋体的检出率。PCR用于诊断生殖器溃疡疾病的另一个优点是使多重分析生殖器溃疡疾病相关的其他病原体成为可能,其中HSV-1和

HSV-2 最为重要(见上文)。最近的一项研究表明,对二期梅毒斑丘性病变进行摩擦后拭子取样,其 PCR 敏感性为 83.9%[118]。PCR 也已广泛应用于 CSF 的检测。一项联合应用 PCR 和 RIT 的多中心研究证实了一个由来已久的观点,即在缺乏神经症状的早期梅毒患者中梅毒螺旋体侵袭神经系统的频率很高[95]。遗憾的是,人们对 CSF-PCR 用于诊断症状性神经梅毒的效用知之甚少。南非的一项研究发现,在 50 例疑似神经性梅毒的患者中,56%的患者表现为 CSF-PCR 阳性[133],但这些发现需要进一步证实。累积证据表明,PCR 也有助于检测新鲜和处理后组织中的密螺旋体。对石蜡包埋的二期梅毒皮肤活检标本的对比分析发现,PCR 对梅毒的诊断效能与 IHC 染色相当,且更易操作[177]。有研究证实,尽管结果不尽相同,传统 PCR 和实时荧光 PCR 应用于血液分析时仍具有诊断价值[116,134,178]。尽管如此,在疑似获得性梅毒的病例中,PCR 应谨慎应用于血液检测,因为人们对其作为传统诊断方法的补充的具体临床应用缺乏共识。

(二)血清学试验

血清学试验除了对早期梅毒病变的直接检测方法具有补充作用外,还可用于潜伏梅毒的诊断及疑似三期梅毒的确证,因而在梅毒诊断中发挥着重要作用(表 62-1 和图 62-3)。另一方面,梅毒临床管理中存在的许多问题皆源于一个事实,即用于协助诊断感染分期和疗效监测的非密螺旋体抗体滴度并不是反映梅毒感染的很好指标。如前所述,非密螺旋体和密螺旋体试验检测的是两种截然不同的抗体反应,在未经治疗和已治疗的感染中具有的不同动力学变化(图 62-3)。当前可用的血清学试验均不能将性病梅毒与地方性梅毒区分开来。

1. 非密螺旋体试验 非密螺旋体抗体试验报告产生充分反应的最高稀释度。当分别使用显微镜和肉眼判读非密螺旋体试验结果时,同一血清的测定滴度可相差 2 至 4 倍,因而强调了同种方法应用于连续血清学试验的重要性,并且实验最好在同一个实验室内进行。当抗体过剩阻碍凝集反应时,含极高滴度非密螺旋体抗体的血清在低倍稀释时可产生微弱、不典型甚至阴性“粗糙”的反应结果,被称为“前带现象”。据估计,这种现象的发生率为 0.83%,可发生在任何临床阶段,特别是在一期和二期梅毒期间[179]。大多数实验室通过将所有样本常规滴定到至少 16 倍稀释度来避免这一问题。

传统梅毒检测策略将非密螺旋体试验作为疑似梅毒的初筛试验。反应性非密螺旋体抗体滴度必须根据梅毒的可疑阶段进行解释,并且需要使用密螺旋体试验进行确认,因为在低患病率人群中,假阳性结果可能占很大比例[180]。约 30%的早期一期梅毒患者在初诊时非密螺旋体试验无反应(图 62-3 和表 62-4),因而强调了直接检测法用于生殖器溃疡的重要性。虽然以密螺旋体抗体为基础的试验的检测敏感性提高了,但在早期一期梅毒感染中也可能为阴性。对于二期梅毒,几乎所有患者的非密螺旋体试验滴度>1:8。大约 1/3 的三期梅毒患者非密螺旋体试验无反应性。

密螺旋体感染以外的其他情况也可引出导致 BFP 反应的抗类脂质抗体。BFP 反应被定义为非密螺旋体试验具有反应性而密螺旋体试验阴性。据报道,许多炎症状态和疾病可导致 BFP[181-182];然而,多数报道缺乏强有力的科学依据。急性 BFP 反应持续时间<6 个月,与短暂性疾病或状态有关,如疟疾[183]、布鲁菌病[184]、单核细胞增多症[185-186]、病毒性肝炎[187]、性病淋巴肉芽肿[188]、病毒性肺炎[189]、肺结核[186]和软下疳[188]。最近,天花疫苗接种被证实可增加 BFP 反应的频率[190]。慢性 BFP 反应,持续时间>6 个月,包括自身免疫性疾病,尤其是系统性红斑狼疮[191]、HIV 感染[187,192]、静脉注射毒品[187]和麻风病[193]。丙型肝炎感染的患者发生 BFP 的可能性是丙型肝炎阴性对照组的 5 倍[194]。

梅毒患者对治疗有效应答可定义为:①疾病的临床表现和症状缓解,②非密螺旋体抗体滴度降低至少 4 倍或采用相同的检测方法时出现 2 个稀释度的改变(如从 1:16 到 1:4),③和(或)血清学试验发生血清学逆转,即从阳性转变为阴性[104]。年龄较小、基线非密螺旋体抗体滴度较高和(或)诊断时处于梅毒较早阶段的患者治疗后更有可能发生血清学治愈[195]。对于治疗后的血清学监测,建议在早期梅毒治疗后的第 6、12 个月和晚期梅毒的第 6、12 和 24 个月复查非密螺旋体抗体滴度。对治疗后的 HIV 感染者和孕妇则可实

施更为频繁的血清学监测。非密螺旋体滴度持续升高4倍提示梅毒再感染或治疗失败，需要进一步的临床评估以明确是否合并HIV感染，以及是否有梅毒螺旋体（*T. pallidum*）的中枢神经系统浸润[104]。

早期的研究者曾报道，大多数一期和二期梅毒患者在接受抗梅毒治疗后应出现非密螺旋体试验的血清学逆转或变为无反应性[196]。然而，一项大型的历史队列回顾性研究发现，早期梅毒患者在接受治疗后的12～36个月发生血清学复常的概率为26%～74%，其具体差异部分归因于患者是否为初始或重复感染[197]。最近一项系统综述对涉及HIV阳性和HIV阴性患者的既往研究分析发现，治疗后出现血清学试验无反应的总体比例为12.1%，但随治疗后时间点的不同而不同[195]。血清学无应答被定义为接受治疗后≥6个月时非密螺旋体抗体滴度下降<4倍。血清固定状态（serofast）被定义为非密螺旋体抗体滴度较初始滴度下降≥4倍但未发生血清学逆转，且保持低滴度阳性水平。血清固定病例的比例可能高达35.2%～44.4%[195]。血清固定状态的临床意义并不明确，需要进一步研究以确定其最佳处理方式。

2. 密螺旋体试验 传统的密螺旋体试验（如FTA-ABS和TP-PA）和大多数较新的商用梅毒螺旋体试验同时检测IgG和IgM，而不区分引起反应的抗体类别。这一特性解释了密螺旋体试验的主要优点，即它们的高度敏感性（除外在一期梅毒期间，此间只有IgM特异性试验更灵敏），同时也解释了密螺旋体试验的主要缺点，即无法区分活动性疾病和非活动性疾病。密螺旋体试验最大的价值在于能鉴别真阳性和假阳性的非密螺旋体试验结果。一般说来，密螺旋体试验预计终身保持阳性；然而，已有报道称，在先前同时感染梅毒和HIV的患者中，密螺旋体抗体试验出现了血清逆转[198]。

与非密螺旋体试验相比，密螺旋体试验在固定稀释度下进行，且滴度不作常规定量。FTA-ABS的反应性被分为1+～4+四个等级。1+的反应性，高度依赖于观察者，被认为是梅毒的可疑证据。然而，由于天然交叉反应抗体的存在，2+的反应性也很有可能为假阳性结果[199]。由于对一期梅毒和未知病程的潜伏期梅毒的敏感性较低，FTA-ABS已不再被认为是检测密螺旋体试验的金标准[200]。TP-PA已被证明对所有阶段的梅毒的敏感性和特异性与目前市场上的任何密螺旋体试验（包括使用重组抗原的EIAs）相当[201-205]。

几项针对密螺旋抗体试验（包括EIAs和化学发光试验）的一对一比较研究为合理使用这些试验提供了一些指导[155, 203-204, 206]。所有商品化EIAs都有很高的诊断特异性（对测试血清盘表现出100%或接近100%的特异性），对二期梅毒的诊断敏感性几乎达到100%也就不足为奇了。Schmidt等[155]精选一期梅毒患者的血清（其MHA-TP结果均无反应性）对9种EIAs进行了评估，结果发现，较高的检测敏感性与以下因素相关：①所用血清的体积和稀释度；②检测方法（如捕获和竞争法较夹心法敏感性更高）；③同时检测IgM和IgG抗体。被检抗体类型包含IgM的试验在诊断一期梅毒时具有较高的敏感性，推测是由于IgM型抗密螺旋体抗体比IgG型抗体较早出现的缘故。IgM-特异性EIAs对一期梅毒的诊断敏感性为88%～90%，二期梅毒为76%～100%，早期潜伏梅毒为19%～69%[207]。IgM-特异性试验有助于区分早期和晚期感染，但目前尚未被CDC推荐用于获得性梅毒的诊断[104]。

3. 梅毒的反向筛查策略 高通量EIAs的可及导致了众多医疗机构所使用的梅毒血清学筛查方式的重大改变[208]。目前，许多大型实验室已从传统的梅毒筛查策略（即，密螺旋体试验用于先前非密螺旋体试验结果的确证）转向反向梅毒筛查策略，即采用密螺旋体试验（如EIA或CLIA）进行筛查，结果具有反应性时，映射性采用一种非密螺旋体试验进行检测[104, 209]。密螺旋体试验阳性而非密螺旋体试验阴性的患者可能为：①非常早期梅毒；②长期的晚期梅毒；③过去治疗过的梅毒；④假阳性的密螺旋体试验结果。因此，仔细询问病史对于区分未经治疗的和先前治疗的梅毒很重要。对于没有梅毒治疗史的个体，应采用另一种密螺旋体试验（最好为TP-PA）进行确证[104]。第二种密螺旋体试验具有反应性，则可确定受检者患有或曾经患有梅毒但没有解决疾病活动性的问题。如果第二种密螺旋体试验无反应性，临床医生可做出决定：无须做进一步的评估或治疗，或者对高危个体进行治疗。梅毒的反向筛查策略可

能会导致患者随访增加、过度治疗，并可能导致更高的成本[210]。在梅毒低流行人群中，反向筛查策略可能导致比传统筛查策略更高比例的假阳性结果[211-212]。因此，在其实施之前应考虑几个问题，包括梅毒患病率、患者感染梅毒的验前概率，以及实验室对自动化的需求。

一些研究已经调查了使用自动化密螺旋体免疫测定的指标值或信号强度来减少反向梅毒筛查策略中对第二种梅毒螺旋体试验的需要[213-215]。指标值的计算方法为：首选用样品的测定 OD 减去空白孔的 OD 值，再除以同批实验的 3 个临界水平校准品的平均 OD 值[213]。Fakile 等[216]最近开展的一项涉及 4 种密螺旋体抗体试验的研究表明，增加的信号强度值与 TP-PA 和 FTA-ABS 确证试验的反应性增加相关。

4. 快速梅毒试验　相对于 TPHA 或 TP-PA 参考标准，对几种快速梅毒试验进行的一对一比较的结果显示其在不同地点均具有良好检测性能[142, 217]。基于密螺旋体抗体的快速试验在非密螺旋体抗体滴度较高的感染期间最敏感；在一期梅毒中观察到的敏感性较低，表明需要在高发病率人群中补充附加检测，以避免遗漏早期梅毒病例[142]。基于密螺旋体抗体检测的快速梅毒试验具有反应性时，应补充非密螺旋体抗体试验，以辅助梅毒的分期。由于有可能出现假阳性结果，在低患病率人群中使用快速梅毒试验作为筛查试验时应谨慎[218]。

(三)神经性梅毒的检测

CSF 异常在缺乏神经系统症状的早期梅毒患者中很常见，其中很多患者的中枢神经系统中存在密螺旋体但不需要加强治疗[95]。基于此，在早期梅毒中并不推荐常规进行腰椎穿刺[104]。一些研究人员建议对血清 RPR 滴度≥1∶32 或 CD4 计数＜350 细胞/μl 的 HIV 感染者进行腰椎穿刺[219]，尽管没有数据表明加强治疗对这些患者具有长远利益。神经性梅毒的诊断是基于临床和实验室检测标准的组合(表 62-1)。CSF 检查应包括 VDRL-CSF 玻片试验、总蛋白质定量和白细胞计数。VDRL-CSF 试验被认为对神经梅毒的诊断具有很高的特异性，但敏感性较低(30%～70%)[104, 220]。因此，无反应性的 VDRL-CSF 试验结果不能排除神经性梅毒。CSF 的 FTA-ABS 试验对神经性梅毒的诊断具有高敏感性，但特异性低，其反应性结果可能是由于 IgG 型抗密螺旋体抗体通过血脑屏障而发生的被动转移，而非鞘内产生的抗体[221]。一些研究表明，CSF-TP-PA 对神经梅毒的诊断具有高度敏感性[222-223]，当 CSF-VDRL 无反应时，将≥1∶640 的血清稀释度作为 TP-PA 的截断值可能有助于识别神经梅毒患者[224]。

(四)HIV 感染者的梅毒检测

人们一致认为梅毒血清学试验对合并 HIV 感染的患者具有良好的诊断效能，对此类患者的诊断准确性值得信赖[104]。然而，对这一陈述需做几点说明。首先，HIV 感染者发生非密螺旋体试验假阳性的概率更高[187, 192]。抗逆转录病毒治疗似乎降低了非密螺旋体抗体试验 BFP 的发生几率[225]。其次，在 HIV 感染个体中非密螺旋体试验滴度往往高于未感染 HIV 的个体[95]，在合并 HIV 感染的早期或晚期潜伏梅毒患者中，发生血清学失败(译者注：治疗后血清学试验转阴)的风险可能会增加[226]。一项系统性回顾研究表明，梅毒治疗后的血清学治愈与 HIV 状态之间的关系一直存在不一致的情况[195]；在 HIV 感染患者中，CD4 计数和 HIV 病毒载量与血清学治愈无关。

(五)先天性梅毒检测

先天性梅毒的监测病例定义没有改变[23](表 62-1)。先天性梅毒的确诊需采用 DF 镜检、荧光抗体或其他特殊染色在新生儿组织、病灶渗出液和(或)分泌物或者妊娠产物（即胎盘或脐带）中发现梅毒螺旋体(*T. pallidum*)。当新生儿的母亲在分娩时患有未经治疗或治疗不彻底的梅毒时，无论新生儿有无症状均可推断为先天性梅毒感染。当新生儿密螺旋体试验具有反应性且满足以下任一条件时也可推断为先天性梅毒感染：①有先天性梅毒的临床证据（即体格检查或影像资料)；②VDRL-CSF 试验具有反应性；③CSF 细胞计数或蛋白质含量升高(无其他原因)；④19S-IgM FTA-ABS 试验或者 IgM 酶联免疫吸附试验(ELISA)具有反应性。然而，目前 CDC 尚未推荐任一商品化的 IgM 试剂用于先天性梅毒的检测。

这项工作得到了 NIAID/NIH 向 JDR 提供的基金($R01\ AI26756$)的部分支持。

本文中的发现和结论是所引用作者的发现和结论，不一定代表 CDC 的观点。

参考文献请扫二维码查阅

第8篇

支原体和专性细胞内细菌

第63章 支原体属、脲原体属及专性细胞内细菌的一般鉴定方法

CÉCILE BÉBÉAR，J. STEPHEN DUMLER

（韩立中 译；余方友、孙自镛 审校）

第64～69章讨论的细菌与本书其他部分所描述的细菌有几个不同的特点，包括缺乏理想的革兰染色的特征，以及除了支原体（*Mycoplasma*）、脲原体（*Ureaplasma*）及部分贝纳特柯克斯体（*Coxiella burnetii*）、惠普尔养障体（*Tropheryma whipplei*）外，需要在细胞内生长。因此，如果临床样本中存在这些微生物，临床微生物学实验室最常用的革兰染色和人工培养基培养通常不能将其检出。诊断这些病原体所致感染的传统方法包括临床标本吉姆萨和瑞氏染色、使用各种血清学方法检测感染相应的抗体，或用组织病理学方法分析活检标本。分子生物学方法和改进的培养方法显著提高了检测这些病原体和诊断其所致疾病的能力。分子生物学技术已成为诊断一些此类感染标准的诊断方法。表63-1总结了此类感染的流行病学特点，表63-2列出了检测这些病原体的常用诊断性试验。

表63-1 无形体（*Anaplasma*）、衣原体（*Chlamydia*）、柯克斯体属（*Coxiella*）、埃利希体属（*Ehrlichia*）、支原体（*Mycoplasma*）、东方体（*Orientia*）、立克次体（*Rickettsia*）、养障体（*Tropheryma*）和脲原体（*Ureaplasma*）感染的流行病学特点及其相关疾病

病原体	疾病	宿主	传播媒介及途径
嗜吞噬细胞无形体（*Anaplasma phagocytophilum*）	人粒细胞无形体病：发热、头痛、肌痛，除中枢神经系统外累及全身	白足鼠、其他小型哺乳动物、反刍动物、鹿	肩突硬蜱（鹿或黑腿蜱虫）、太平洋硬蜱（西方黑腿蜱虫）、蓖子硬蜱（兔虱）、全沟硬蜱（泰加蜱）叮咬、嗜群血蜱（残蜱）
流产衣原体（*Chlamydia abortus*）	自发性流产	反刍动物	在生育季节接触受感染绵羊或山羊
肺炎衣原体（*Chlamydia pneumoniae*）	肺炎、支气管炎、鼻窦炎、咽炎	人	气溶胶传播
鹦鹉热衣原体（*Chlamydia psittaci*）	鹦鹉热（肺炎）、全身感染	鸟、家畜	直接接触或气溶胶传播
沙眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*）	地方性沙眼，包括角膜结膜炎、尿道炎、附睾炎、子宫内膜炎、输卵管炎、肝周炎、肺炎、性病淋巴肉芽肿、直肠炎	人	性接触、手眼接触、昆虫污染物传播、感染的产道
贝纳特柯克斯体（*Coxiella burnetii*）	急性Q热（自限性发热伴或不伴肺炎、肝炎）、慢性Q热（心内膜炎、血管内感染）、先天感染	牛、绵羊、山羊、猫、兔、狗、蜱	气溶胶吸入、摄入未经消毒的乳制品、蜱虫
查菲埃里希体（*Ehrlichia chaffeensis*）	人单核细胞埃里希体病（HME）：发热、头痛、肌痛、累及全身包括中枢神经系统	白尾鹿、狗及其他犬科动物、浣熊	美洲钝眼蜱（美洲花蜱）和变异革蜱（美洲犬蜱））叮咬

（续 表）

病原体	疾病	宿主	传播媒介及途径
尤因埃里希体（*Ehrlichia ewingii*）	"Ewingii"埃里希体病：发热、头痛、肌痛，主要发生于免疫功能低下患者	狗及其他犬科动物	美洲钝眼蜱（美洲花蜱）叮咬
鼠埃里希体 *eauclairensis* 亚种（*Ehrlichia muris* subsp. *eauclairensis*）	鼠埃里希体 *eauclairensis* 亚种病	小型哺乳动物	肩突硬蜱（鹿或黑腿蜱虫）
生殖支原体（*Mycoplasma genitalium*）	尿道炎、宫颈炎、子宫内膜炎、输卵管炎、输卵管因素性不孕、早产、流产	人	性接触
人型支原体（*Mycoplasma hominis*）	细菌性阴道病、子宫内膜炎、输卵管炎、输卵管因素性不孕症、流产后菌血症、新生儿感染（尤其是早产儿）、急性肾盂肾炎、免疫抑制菌血症、关节炎、胸膜感染、手术部位感染、胸心移植受者纵隔炎及免疫抑制患者的其他生殖器外感染	人	泌尿生殖道共生菌、性接触、宫内或产时的垂直传播、泌尿道阻塞或内固定、实体器官移植受体的供体源性感染
肺炎支原体（*Mycoplasma pneumoniae*）	气管支气管炎、肺炎、咽炎、肺外并发症（脑膜脑炎、关节炎等）	人	接触感染性气溶胶或污染物
恙虫病东方体（*Orientia tsutsugamushi*）	恙虫病	螨（幼虫螨虫）	恙螨叮咬
非洲立克次体（*Rickettsia africae*）	非洲蜱热	蜱，其他未确定的疫源地	蜱叮咬
小蛛立克次体（*Rickettsia akari*）	立克次体痘	鼠及其他小型哺乳动物	血异刺皮螨（鼠螨）叮咬
澳大利亚立克次体（*Rickettsia australis*）	昆士兰蜱斑疹伤寒	小型有袋动物	全环硬蜱（有袋蜱）叮咬
康诺尔立克次体（*Rickettsia conorii*）	南欧斑疹热或地中海斑疹热	小型哺乳动物，蜱	血红扇头蜱（牛蜱）叮咬
猫立克次体（*Rickettsia felisli*）	蚤传斑点热	蚤，负鼠，猫，狗，鼠	被粪便污染的跳蚤咬伤或猫蚤叮咬
黑龙江立克次体（*Rickettsia heilongjiangensis*）	远东蜱传立克次体病	蜱，其他疫源地？	革蜱属和血蜱属某些种叮咬
霍氏立克次体（*Rickettsia honei*）	弗林德斯岛斑疹热	老鼠，爬行动物？	哈氏凹沟蜱（*Aponomma hydrosauri*）［爬行动物蜱虫（reptile tick）］、颗粒硬蜱、硬蜱属某些种、*Rhipicephalus* 某些种叮咬
日本立克次体（*Rickettsia japonica*）	日本红斑热	啮齿动物，小型哺乳动物，家畜和野生动物，蜱类	革蜱、血蜱和卵硬蜱叮咬
帕氏立克次体（*Rickettsia parkeri*）	美洲蜱叮咬热	小型哺乳动物	蜱叮咬
普氏立克次体（*Rickettsia prowazekii*）	原生虱传斑疹伤寒	人，虱子，松鼠	体虱叮咬，破损的皮肤或黏膜接触感染的虱子粪便，气溶胶吸入
	Brill-Zinsser 病	人	虱源性斑疹伤寒初次发作后的复发
立氏立克次体（*Rickettsia rickettsii*）	落基山斑疹热	蜱，中小型哺乳动物	感染的变异革蜱（美洲犬蜱）、安氏革蜱（硬蜱）、血红扇头蜱（中北美洲）、卡延钝眼蜱（中南美洲）叮咬

（续 表）

病原体	疾病	宿主	传播媒介及途径
西伯利亚立克次体（*Rickettsia sibirica*）	北亚蜱斑疹伤寒，淋巴结炎相关性立克次体病	蜱虫	革蜱属、血蜱属、璃眼蜱属某些种和红蜱微小扇头蜱叮咬
斯洛伐克立克次体（*Rickettsia slovaca*）	蜱传性淋巴结病	家养和野生哺乳动物，蜱虫	革蜱属某些种叮咬
地方性，斑疹伤寒立克次体（*Rickettsia typhi*）	鼠型斑疹伤寒	鼠及其他啮齿动物，负鼠	开皇客蚤（鼠蚤）和栉头蚤（猫蚤）叮咬，擦破皮肤或黏液接触跳蚤的粪便，气溶胶的吸入
惠普尔养障体（*Tropheryma whipplei*）	惠普尔病：慢性腹泻，吸收不良，关节炎，体重减轻，淋巴结病，葡萄膜炎/视网膜炎/眼内炎，心内膜炎，脑炎，免疫重建炎性综合征，急性肠胃炎，胸腔积液，肺浸润，纵隔淋巴结病	人	环境接触（污水、人类粪便、唾液）、遗传易感性，在无症状感染人群中的粪－口传播
解脲脲原体（*Ureaplasma urealyticum or Ureaplasma parvum*）	尿道炎，睾丸附睾炎，泌尿系统结石，流产，绒毛膜羊膜炎，早产，早产儿的新生儿感染，免疫抑制患者的关节炎和其他生殖器外感染，肺移植受者和其他免疫抑制患者的高氨血症	人	泌尿生殖道共生菌，性接触，宫内或分娩时的垂直传播，实体器官移植受者的供者源性感染

表 63-2 无形体（*Anaplasma*）、衣原体（*Chlamydia*）、柯克斯体（*Coxiella*）、埃里希体（*Ehrlichia*）、支原体（*Mycoplasma*）、东方体（*Orientia*）、立克次体（*Rickettsia*）、养障体（*Tropheryma*）和脲原体（*Ureaplasma*）的诊断性试验

病原体	诊断性试验[a]
嗜吞噬细胞无形体（*Anaplasma phagocytophilum*）	镜检：用吉姆萨或瑞氏染色检查患者外周血或白细胞层涂片，阳性率约为 60% 抗原检测：尚无商品化试剂；CDC 提供 IHC 法 分子生物学方法：在疾病的急性期治疗前采集 EDTA 抗凝血可用于 NAATs，具有种特异性和属特异性，目前活动性感染诊断的可选择方法 培养：将 EDTA 抗凝外周血接种到 HL-60 或其他髓细胞的细胞系上；如果在抗菌治疗之前取材且在 24 h 内接种，多数样本可在 3～30 天内获得阳性结果；但是不能即时获得结果的缺点影响了这一方法的广泛应用 血清学试验：IFA 是最常用的方法。具有人粒细胞无浆体病典型临床表现患者，IgG 滴度呈 4 倍或 4 倍以上升高可确认感染，IgG 滴度≥128，为诊断感染提供支持性证据。IgG 试验敏感性为 90%～100%，特异性约为 95%。不推荐 IgM 检测。可与查菲埃里希体（*Ehrlichia chaffeensis*）发生交叉反应
肺炎衣原体（*Chlamydiaceae pneumoniae*）	镜检：吉姆萨染色或检测脂多糖的直接免疫荧光试验都可检出病原体，但这 2 种试验均不敏感 抗原检测：现有的针对 LPS 的 EIAs 方法可检测所有的衣原体（*Chlamydiaceae*），但目前仅被批准用于检测沙眼衣原体（*C. trachomatis*） 分子生物学方法：除了多重方案，尚无 FDA 批准的分子生物学方法 培养：被广泛认为对诊断确认不敏感。在 HL 细胞或 Hep-2 细胞中生长良好。只能在参比实验室开展 血清学试验：MIF 法是可选择的诊断方法，确诊标准为抗体滴度呈 4 倍或 4 倍以上，或单份样本 IgM 滴度≥16 和（或）IgG 滴度≥512。但是，MIF 结果解读复杂，且越来越多地被 EIAs 所取代
鹦鹉热衣原体（*Chlamydia psittaci*）	镜检：吉姆萨染色或检测脂多糖的直接免疫荧光试验都可检出病原体，但这 2 种试验均不敏感 抗原检测：针对 LPS 的 EIA 方法可检测所有的衣原体（*Chlamydiaceae*），但目前仅被批准用于检测沙眼衣原体（*C. trachomatis*） 分子生物学方法：尚无商品化试剂 培养：需要三级生物安全防护的设备和操作。可在多种细胞系包括 McCoy 和 HeLa 细胞中生长 血清学试验：MIF 法具有高敏感性和特异性（可选试验）

（续 表）

病原体	诊断性试验[a]
沙眼衣原体(*Chlamydiaceae trachomatis*)	镜检:可用DFA试验或吉姆萨染色检测。尽管DFA试验更灵敏,但这两种方法均不应单独使用 抗原检测:用于沙眼衣原体(*C. trachomatis*)检测的商品化EIAs试剂被认为不符合标准,不推荐使用,且不适合筛查尿或阴道拭子。和培养相比,床旁检测仅62%～72%的敏感性;和分子生物学方法相比,此法只有33%～50%的敏感性 分子生物学方法:FDA批准的商用NAATs(PCR、转录介导扩增、链置换扩增)可用于沙眼衣原体感染的诊断 培养:病原体能够使用多种细胞系(如McCoy和HeLa229细胞)培养,该法的敏感性低于分子生物学方法,而且受送检标本质量的影响。只有参比实验室可以开展 血清学试验:MIF法对新生儿肺炎和性病淋巴肉芽肿有高灵敏性和特异性(可选试验),但不推荐用于沙眼衣原体(*Chlamydiaceae trachomatis*)引起的其他衣原体(*Chlamydiaceae*)感染。4倍或更高抗体滴度的上升具有显著意义,但慢性、反复性或全身性感染可能观察不到抗体滴度的上升。单一IgM滴度≥32支持新生儿肺炎的诊断。但是,MIF结果解读复杂,且越来越多地被EIAs所取代
贝纳特柯克斯体(*Coxiella burnetii*)	镜检:可用DFA或IHC方法,但并未广泛使用 抗原检测:尚无商品化试剂 分子生物学方法:NAATs法主要用在参比实验室中,在感染前2周,这些方法比血清学方法更敏感。全血或白细胞有更高浓度的病原体,血清仍然是可以用的。在慢性Q热心内膜炎中,心脏瓣膜组织比血液更敏感 培养:需要三级生物安全水平的实验室设施和操作;HHS和USDA选择代理商。动物(老鼠)接种是最敏感的。病原菌还能够使用多种细胞系培养,尤其是HEL、Vero、RK13、THP1或A549细胞,以及鸡胚。酸化枸橼酸半胱氨酸的无菌培养基2(ACCM-2)已被开发,但尚未被证实可用于原代分离培养 血清学试验:这是最常用的诊断方法。Ⅱ相抗原IgG滴度呈4倍或4倍以上升高确认为急性Q热,单份血清Ⅰ相抗原IgG滴度≥512确认为慢性Q热;对于心内膜炎,*C. burnetii*的抗Ⅰ相抗原IgG滴度≥800可被诊断,这也是修正的杜克标准中的一个主要指标。抗体效价下降表明治疗有效。推荐使用可检测Ⅰ相和Ⅱ相IgG的IFA试验。已有商品化的IgMⅡ相抗原酶联免疫吸附试验试剂,但只用于急性Q热的诊断
查菲埃里希体(*Ehrlichia chaffeensis*)	镜检:吉姆萨或瑞氏染色检查感染者外周血或白细胞层涂片阳性率达29% 抗原检测:尚无商品化的试剂。CDC可提供IHC法 分子生物学检测:在疾病的急性期治疗前采集EDTA抗凝血可用于NAATs。具有种和属特异性。是活动性感染的现有可选方法。其敏感性范围为56%～100% 培养:将EDTA抗凝的外周血或脑脊液接种到DH82、THP1、HEL-22、VeroHL-60或其他细胞系上。如果在抗菌治疗前采集样本并在12h内接种,大多数样本会在培养的5～30天出现阳性。因为不能即时获得结果而影响了这一方法的广泛应用 血清学试验:IFA是最常用的方法。具有典型临床症状的人单核埃立克体病患者,IgG滴度≥4倍升高可确诊感染,单次IgG滴度峰值≥128提供支持性证据。采用配对急性期和恢复期样本,IgG检测敏感性高;特异性约95%。不推荐检测IgM。与噬细胞芽胞杆菌可发生交叉反应
尤因埃里希体(*Ehrlichia ewingii*)	镜检:吉姆萨或瑞氏染色检查感染者外周血或白细胞层涂片,偶尔可观察到在感染人群的中性粒细胞中的细菌成簇(桑椹胚) 抗原检测:无可用试验 分子生物学检测:EDTA抗凝血可用于疾病的急性期治疗前的NAATs检测。种和属特异性检测可在一些参考实验室和公共卫生实验室进行。目前,此法是感染活动期的可选方法。敏感性尚未知,但可能较高 培养:尚无体外培养方法 血清学试验:无特异性抗体可用。抗体测试主要基于它与*Ehrlichia chaffeensis*的交叉反应性,单独使用不具有诊断价值

（续 表）

病原体	诊断性试验[a]
鼠埃里希体 *eauclairensis* 亚种（*Ehrlichiamun* subsp. *eauclairensis*）	镜检：应当进行吉姆萨或瑞氏染色检查感染者外周血或白细胞层涂片，但人类白细胞中尚未发现该细菌簇 抗原检测：尚无可用试验 分子生物学检测：在疾病的急性期治疗前采集 EDTA 抗凝血用于 NAATs。种特异性检测可在一些参考实验室和公共卫生实验室进行。可作为活动性感染的诊断性试验。敏感性尚未知，但可能较高 培养：很少进行分离培养，但已成功在 ISE6 蜱细胞和 RF/6A 内皮细胞中培养 血清学试验：目前仅在某些公共卫生实验室开展；与 *Ehrlichia chaffeensis* 有交叉反应
生殖支原体（*Mycoplasma genitalium*）	镜检：生殖道液体经 DNA 荧光染料（赫斯特 33258 或吖啶橙）染色后可能检出，但不特异，不推荐用于诊断目的 抗原检测：不建议用于诊断 分子生物学检测：NAATs 是检测该病原体唯一可行的手段。FDA 批准的单独或与其他性传播感染（STD）病原体联合检测生殖支原体的商业试剂盒目前在美国没有，但在欧洲和许多国家都有。RUO 商用 NAATs 可在美国参考实验室获得 培养：生长条件尚未建立完善，但长时间的细胞培养可获阳性。普遍认为此法用于确诊不敏感 血清学试验：已有 MIF 和 Western 免疫印迹法，然而尚未商品化
人型支原体（*Mycoplasma hominis*）	镜检：体液经 DNA 荧光染料（赫斯特 33258 或吖啶橙）染色后可能检出，但不特异，不推荐用于诊断目的 抗原检测：尚无商品化产品可用 分子生物学检测：由于快速增殖，NAATs 虽已建立，但不及培养实用。在数个国家商品化试剂盒已出现，可同时检测人型支原体，生殖支原体（*M. genitalium*），脲原体（*Ureaplasma*）属及其他性传播病原体。尚未获得 FDA 批准，但 RUO 商用 NAATs 可在美国参考实验室获得 培养：病原体可分离自各种临床标本。推荐使用涤纶或聚酯拭子，避免使用棉签。支原体（*Mycoplasma*）极不稳定，应该使用适当的运送培养基。可在 SP4 肉汤和添加精氨酸的琼脂（最好）、Shepard 10B 肉汤，或 A8 琼脂中复苏。2～4 天生长。欧洲有多种检测、定量、鉴定和药敏试验的试剂盒，用于检测泌尿生殖系统标本中的解脲支原体和人型支原体，目前有 2 种产品已获得美国 FDA 的批准 血清学试验：美国尚无商品化试剂且不推荐用于常规检测
肺炎支原体（*Mycoplasma pneumoniae*）	镜检：体液经 DNA 荧光染料（赫斯特 33258 或吖啶橙）染色后可能被检出，但不特异。不推荐用于以诊断为目的的检测 抗原检测：不建议用于诊断 分子生物学检测：NAATs 是首选的方法，在大多数情况下比血清学和培养法具有更高的分析和临床敏感性。实时聚合酶链反应（real-time PCR）对早期肺炎支原体感染高度敏感。在美国和欧洲，FDA 批准的商业试剂盒可单独或与其他呼吸道病原体联合检测肺炎支原体 培养：各种临床标本中均可分离出此病原体。推荐使用涤纶或聚酯拭子，避免使用棉签。支原体（*Mycoplasma*）极不稳定，应该使用适当的运送培养基。可在 SP4 葡萄糖肉汤或琼脂中复苏，需生长 21 天或更长时间。普遍认为用于确诊不敏感 血清学试验：与补体结合实验和 IFA 相比，EIA 更为敏感和特异；血清抗体滴度增加 4 倍以上更具临床意义。但单份血清样品 IgM 抗体检测可能有助于诊断。不推荐冷凝集试验用于肺炎支原体感染的诊断
恙虫病东方体（*Orientia tsutsugamushi*）	镜检：皮肤或其他组织可进行 DFA 或 IHC 检测，但尚未普及 抗原检测：尚无可用试验 分子生物学检测：对疾病急性期患者 EDTA 或枸橼酸钠抗凝血、白细胞层、血浆或组织样品，以及从患者身上发现的节肢动物进行 NAATs；只在参考实验室开展该检测。当用于活检标本和焦痂拭子时，NAATs 提供了更高的诊断率。实时 PCR 是诊断恙虫病急性期的首选方法 培养：需要三级生物安全防护设备和操作。通过小鼠腹膜内接种进行分离培养。只可在参考实验室和研究室进行 血清学试验：当 IFA 试验用于流行地区患者检测时，入院 IgM-IFA 滴度的折点为≥1∶3200，或成对样本恢复期滴度上升 4 倍以上达到≥1∶3200 时可诊断；旅行者和非流行地区人群使用较低的阈值。当 IgG 滴度阈值为 128，IgM 为 32 时，利用光学显微镜进行检测的间接免疫过氧化物酶法也是敏感及特异的。Dot EIA 试剂盒的敏感性和特异性比 IFA 低。外斐（变形杆菌）OX-K 热凝集试验不敏感且不特异，不推荐使用

（续 表）

病原体	诊断性试验[a]
非洲立克次体（*Rickettsia africae*），康诺尔立克次体（*Rickettsia conorii*），和 Rickettsia parken spotted fever group rickettsiae (see R. rickettsii below)	镜检：DFA 或 IHC 法检测患者皮疹或焦痂等皮肤活检标本斑点热群立克次体是敏感和特异的。抗体尚未商品化 抗原检测：无可用试验 分子生物学检测：对疾病急性期患者 EDTA 或枸橼酸钠抗凝血、白细胞层、血浆、皮肤活检标本或组织样品，以及从患者身上发现的节肢动物进行 NAATs，只在参考实验室开展此检测。当用于活检标本和焦痂拭子时，NAATs 提供了更高的诊断率 培养：需要三级生物安全防护设备和操作，将在抗立克次体治疗之前采集的肝素抗凝血浆或白细胞层细胞或经研磨的皮肤活检标本接种到已接种有 Vero、L-929、HEL 或 MRC5 等细胞系的壳瓶中。48～72 h 后用 Giemsa、Gimenez、免疫荧光或 PCR 法检测感染的细胞，敏感性达 59% 血清学试验：IFA 法在使用 *R. africae*、*R. conorii*、*R. parkeri* 或其他斑点热群立克次体作为抗原（如 *R. rickettsii*）时敏感，但在疾病急性期时敏感性低。通常认为滴度升高 4 倍最为特异，但单次 IgG 滴度≥128 和 IgM 滴度≥32 时被认为具有诊断意义。分别采用 128 和 32 作为 IgG 和 32 IgM 折点的间接免疫过氧化物酶也是敏感和特异的。Dot-EIA 对 *R. Conorii* 的敏感性和特异性较低
小蛛立克次体（*Rickettsia akari*）	镜检：用 DFA 或 IHC 法检测患者皮疹或焦痂等皮肤活检标本，对过渡的斑点热群立克次体敏感和特异。抗体尚未商品化 抗原检测：尚无可用试验 分子生物学检测：对疾病急性期患者 EDTA 或枸橼酸钠抗凝血、白细胞层、血浆、焦痂皮肤活检标本或组织样品，以及从患者身上发现的节肢动物进行 NAATs，只在参考实验室开展此检测。当用于活检标本和焦痂拭子时，NAATs 提供了更高的诊断率 培养：将肝素抗凝血浆或白细胞层细胞接种到已接种有如 Vero、L-929、HEL 或 MRC5 等细胞系的壳瓶中。48～72 h 后用吉姆萨、Gimenez 或荧光抗体染色感染的细胞或者进行 PCR。敏感性未知 血清学试验：IFA 法在使用 *R. akari* 或其他斑点热群立克次体（*Rickettsia*）作为抗原（如 *R. rickettsii*）时敏感，但在疾病急性期时敏感性低。通常认为滴度升高 4 倍最为特异，但是单次 IgG 滴度≥128 和 IgM 滴度≥32 时被认为具有诊断意义。*R. akari* 特异性检测可在参考实验室或公共卫生实验室进行
猫立克次体（*Rickettsia felisli*）	镜检：尚无 抗原检测：尚无 分子生物学检测：对疾病急性期患者 EDTA 或枸橼酸钠抗凝血、白细胞层、血浆或组织样品，以及从患者身上发现的节肢动物进行 NAATs。只在参考实验室开展。当用于活检标本和焦痂拭子时，NAATs 提供了更高的诊断率 培养：只在研究室进行。对 *R. felisli* 在 28 或 32℃ 条件下进行 Shell-vial 培养，并结合实时 PCR，可提高对蚤传斑点热的诊断 血清学试验：IFA 法在使用 *R. felisli* 或其他斑点热群或斑点伤寒群立克次体作为抗原时敏感，但在疾病急性期时敏感性低。通常认为滴度升高 4 倍最为特异，但具诊断意义的滴度阈值尚未建立。*R. felisli* 特异性检测可在参考实验室或公共卫生实验室进行
普氏立克次体（*Rickettsia prowazekii*）	镜检：尚无 抗原检测：尚无 分子生物学检测：对疾病急性期 EDTA 或枸橼酸钠抗凝血、白细胞层、血浆或组织样品，以及从患者身上发现的节肢动物进行 NAATs。只在参考实验室开展。当用于活检标本和焦痂拭子时，NAATs 提供了更高的诊断率 培养：需要三级生物安全防护设备和操作。使用 HHS 和 USDA 选择培养基。将肝素抗凝血浆或白细胞层细胞接种到已接种有如 Vero，L-929，HEL 或 MRC5 等细胞系的壳瓶中。48～72 h 后用吉姆萨、Gimenez 或荧光抗体染色检测感染的细胞。敏感性未知 血清学试验：IFA 法在使用 *R. prowazekii* 或 *R. Typhias* 作为抗原时均敏感。通常认为滴度升高四倍最为特异。但单次 IgG 滴度≥128 和 IgM 滴度≥32 时被认为具有诊断价值。由于广泛的血清学交叉反应，斑点热群立克次体的阳性检测不是特异性的

（续　表）

病原体	诊断性试验[a]
立氏立克次体（*Rickettsia rickettsii*）	镜检：用 DFA 或 IHC 法检测患者皮疹等皮肤活检标本具有 70% 的敏感性及 100%的特异性。抗体尚未商品化 抗原检测：尚无 分子生物学检测：对疾病急性期 EDTA 或枸橼酸钠抗凝血、白细胞层、血浆或组织样品，以及从患者身上发现的节肢动物进行 NAATs。只在参考实验室开展 培养：需要三级生物安全防护设备和操作，将肝素抗凝血浆或白细胞层细胞接种到已接种有如 Vero、L-929、HEL 或 MRC5 等细胞系的壳瓶中。48～72 h 后用吉姆萨，Gimenez，或荧光抗体染色或 PCR 检测感染的细胞。敏感性未知 血清学试验：IFA 法在使用 *R. rickettsiior* 或其他斑点热群立克次体作为抗原时敏感，但在疾病急性期时敏感性低。通常认为滴度升高 4 倍最为特异。但单次 IgG 滴度≥128 和 IgM 滴度≥32 时被认为具有诊断意义。由于斑点热群立克次体物种之间广泛的血清学交叉反应，对立克次体感染的血清学试验阳性不是特异性的
地方性，斑疹伤寒立克次体（*Rickettsia typhi*）	镜检：DFA 或 IHC 法检测患者皮疹等皮肤活检标本既敏感又特异。抗体尚未商品化 抗原检测：尚无 分子生物学检测：对疾病急性期 EDTA 或枸橼酸钠抗凝血、白细胞层、血浆或在组织样品，以及从患者身上发现的节肢动物进行 NAATs。只在参考实验室开展。当用于活检标本时，PCR 提供了更高的诊断率 培养：需要三级生物安全防护设备和操作，将肝素抗凝血浆或白细胞层细胞接种到已接种有 Vero、L-929、HEL 或 MRC5 等细胞系的壳瓶中。48～72 h 后用吉姆萨、Gimenez 或荧光抗体染色或 PCR 可检测感染的细胞。敏感性未知 血清学试验：IFA 法在使用 *R. prowazekii* 或 *R. typhias* 作为抗原时敏感。通常认为滴度升高 4 倍最为特异。但单次 IgG 滴度≥128 和 IgM 滴度≥32 时被认为具有诊断意义。当 IgG 和 IgM 的折点分别定为 128 和 32 时，间接免疫过氧化物酶也是敏感和特异的诊断方法。与 IFA 相比，Dot-EIA 对伤寒立克次体的敏感性和特异性稍低。可与斑点热群立克次体种发生交叉反应
惠普尔养障体（*Tropheryma whipplei*）	镜检：组织活检用高碘酸-希夫染色、IHC 或荧光原位杂交、电子显微镜检查 抗原检测：尚无 分子生物学检测：NAATs 是目前特异性诊断的推荐方法。可对新鲜、冷冻或石蜡包埋的小肠活检标本、心脏瓣膜组织、淋巴结、肝、滑膜、中枢神经系统的样品，以及皮肤、唾液和大便进行检测。可在参考实验室进行 培养：分离培养时间长（>30 天），目前世界各地只有少数研究室和参考/公共卫生实验室中可以进行 血清学试验：目前意义不大
解脲脲原体和微小脲原体（*Ureaplasma urealyticum or Ureaplasma parvum*）	镜检：体液经 DNA 荧光染料（赫斯特 33258 或吖啶橙）染色后可能被检出，但不特异。不推荐用于诊断目的 抗原检测：尚未商品化 分子生物学检测：NAATs 虽已建立但不及培养实用。多个国家已有商业化试剂盒，可同时检测人型支原体、生殖支原体、解脲支原体和其他性传播感染病原体。尚无 FDA 批准的试剂盒，但 RUO 商用 NAATs 可在美国参考实验室获得 培养：病原体可分离自各种临床标本。推荐使用涤纶或聚酯拭子，避免使用棉签。脲原体（*Ureaplasma*）极不稳定，应该使用适当的运送培养基。可在 Shepard 的 10B 尿素肉汤和 A8 琼脂中复苏。2～4 天生长。欧洲有多种检测、定量、鉴定和药敏试验的试剂盒，用于检测泌尿生殖系统标本中的解脲支原体和人型支原体，目前有两种产品已获得美国 FDA 的批准 血清学试验：不推荐用于常规检测

注：[a] 缩写词，DFA. 直接荧光抗体；EIA. 酶联免疫试验；HHS. 卫生和公共服务部；IFA. 间接荧光抗体；IHC. 免疫组织化学；LPS. 脂多糖；MIF. 微量免疫荧光；NAATs. 核酸扩增试验；RUO. 仅用于研究；STI. 性传播感染；USDA. 美国农业部

（参与翻译人员：曾倩）

第64章　支原体属和脲原体属

KEN B. WAITES, CÉCILE BÉBÉAR

（韩立中　译；余方友、孙自镛　审校）

一、分类学

支原体（*Mycoplasma*）（"真菌状"）归属于柔膜纲（"柔膜"），这个纲包括4目、5科、8属，已知约200个种，见表64-1。新的种主要在动物中不断被发现。表64-2列出了在多种条件下分离自人类的16个种，但不包括动物来源偶尔从人类免疫抑制状态的宿主检出的菌种，因而这些种被认为是暂时性定植者。*Mycoplasma amphoriforme* 是最新发现的一个种，从几位抗体缺乏和患有慢性支气管炎或支气管扩张的患者中分离[1]。柔膜纲属于真细菌以基因缺失的方式从梭状芽胞杆菌样革兰阳性细菌进化而来。现有的种特异性聚合酶链反应技术（species-specific PCR, PCR）有效地改善了苛养的柔膜纲在细菌培养和鉴定中存在的困难。因此，尽管迄今尚未用此类技术发现任何人源性微生物新菌种，但某些未知且难以培养的菌种可以通过非培养技术被发现。

表64-1　支原体分类和某些鉴别特征（柔膜纲）

柔膜纲分类	鉴别特征			
	是否需要甾醇	染色体大小（kbp）	G+C含量（mol%）	其他
目Ⅰ：支原体目				脊椎动物宿主
科Ⅰ：支原体科				需要甾醇
属Ⅰ：支原体（119种）[a]	是	580～1350	23～40	
属Ⅱ：脲原体（*Ureaplasmas*）（7种）[b]	是	730～1170	25～32	水解尿素
目Ⅱ：*Entomoplasmatales*				植物/昆虫宿主
科Ⅰ：*Entomoplasmataceae*				非螺旋结构
属Ⅰ：*Entomoplasma*（6种）	是	870～900	27～34	需要甾醇
属Ⅱ：*Mesoplasma*（11种）	否	825～930	26～32	需要甾醇（+/-）
科Ⅱ：*Spiroplasmataceae*				螺旋结构
属Ⅰ：*Spiroplasma*（38种）	是	780～2200	24～31	需要甾醇（+/-）
目Ⅲ：*Acholeplasmatales*[c]				不需要甾醇
科Ⅰ：*Acholeplasmataceae*	否	1500～1650	26～36	
属Ⅰ：*Acholeplasma*（18种）				
目Ⅳ：*Anaeroplasmatales* 专性厌氧				
科Ⅰ：*Anaeroplasmataceae*				
属Ⅰ：*Anaeroplasma*（4种）	是	1500～1600	29～33	需要甾醇
属Ⅱ：*Asteroleplasma*（1种）	否	1500	40	不需要甾醇
"*Phytoplasma* 暂定种"[c]（41种）	未知	530～1350	23～29	

注：[a] 包括亚种，支原体属包括一些细胞壁缺陷、无法培养的寄生菌暂定种。有些原来归属于 *Haemobartonella* 和 *Eperythrozoon* 属。其G+C量和甾醇需要情况未知。[b] 解脲脲原体和微小脲原体，以前被认为是解脲脲原体生物群，现在分为2个不同的种，是唯一的人源性脲原体。[c] *Phytoplasmas* 是植物和昆虫的柔膜纲的暂定种，与 *Acholeplasmatales* 有遗传相关性

表 64-2　人源柔膜纲的主要定植部位、代谢和致病性

种名	主要定居部位		代谢		致病性
	呼吸道	泌尿生殖道	葡萄糖	精氨酸	
唾液支原体(*M. salivarium*)	+	−	−	+	−
口腔支原体(*M. orale*)	+	−	−	+	−
颊支原体(*M. buccale*)	+	−	−	+	−
咽支原体(*M. faucium*)	+	−	−	+	−
嗜脂支原体(*M. lipophilum*)	+	−	−	+	−
双孢支原体(*M. amphoriforme*)[a]	? +	−	+	−	?
肺炎支原体(*M. pneumoniae*)	+	−	+	−	+
人型支原体(*M. hominis*)	+	+	−	+	+
生殖支原体(*M. genitalium*)[b]	+	+	+	−	+
发酵支原体(*M. fermentans*)	+	+	+	+	+
灵长支原体(*M. primatum*)	−	+	−	+	−
嗜精子支原体(*M. spermatophilum*)	−	+	−	+	−
梨支原体(*M. pirum*)	?	?	+	+	−
穿透支原体(*M. penetrans*)	−	+	+	+	?
脲原体(*Ureaplasma* spp.)[c]	+	+	−	−	+
莱氏无甾醇原体(*A. laidlawii*)	+	−	+	−	−

注：[a] 目前报道的所有菌株均来自下呼吸道，未在其他部位采样；[b] 该病原体曾在咽部检出，但口咽部作为常见或主要病灶似乎不太可能；[c] *U. urealyticum* 和 *U. parvum* 都能分解尿素

二、柔膜纲的描述

柔膜纲所有菌属常被统称为"支原体（*Mycoplasma*）"，而不管这些微生物是否真正属于支原体属。更准确的表述是"柔膜纲"指代所在菌属，如"支原体属（*Mycoplasma*）"、"脲原体属（*Ureaplasmas*）"、"无胆甾支原体属（*Acholeplasmas*）"等。柔膜纲属的细胞直径和基因组小于传统意义上的细菌，是已知能独立生存的最小生物体。与人类有关的支原体大小不一，有的如人类球形细胞，直径 0.2～0.3 μm，如脲原体属(*Ureaplasmas*)的某些种和人型支原体(*M. hominis*)[2]；有的如锥形杆，长 1～2 μm，宽 0.1～0.2 μm，如肺炎支原体(*M. pneumoniae*)[3]。柔膜纲属由 3 层细胞膜包绕，但没有细胞壁。细胞壁屏障永久性的缺失使柔膜纲成为独一无二的原核生物，使之区别于 L 型细菌(L 型细菌细胞壁的缺陷是细菌对恶劣环境暂时的反应)。细胞壁缺失也使柔膜纲对 β-内酰胺类抗菌药物不敏感，同时不能使革兰染液着色，也是其具有多形性的主要原因。极小的基因组[如生殖支原体(*M. genitalium*)，将近 600 kb]和有限的生物合成能力，解释了这些生物的寄生和腐生存在。它们对环境的敏感及苛刻的生长条件，导致了需要复杂的培养检测方法。

柔膜纲需要富含核酸前体的丰富的生长培养基。除了 *acholeplasmas*、*asteroleplasmas* 和 *mesoplasmas*，柔膜纲的生长培养基中还需要添加固醇类及血清。在培养基上的生长速度因菌种而异，脲原体属(*Ureaplasmas* spp.)培养约 1 h，肺炎支原体(*M. pneumoniae*)6 h，生殖支原体(*M. genitalium*)16 h[4]。

典型的支原体菌落直径从 15～300 μm 不等。某些种的菌落，如人型支原体(*M. hominis*)，往往表现为菌落中心生长更深而周边较浅的"荷包蛋"样外观(图 64-1)，而其他支原体如肺炎支原体(*M. pneumoniae*)，可产生球形菌落(图 64-2)。支原体菌落可以用肉眼观察，而脲原体(*Ureaplasmas*)菌落直径通常为 15～60 μm，需用低倍显微镜才能观察到(图 64-3)。

人源性支原体和脲原体可以根据其是否利用葡萄糖、精氨酸或尿素而(表 64-2)进行分类。利用尿素产生代谢能量是脲原体独特的特征，除此之外的其他生化特征不足以用于种属鉴别。来源

于反刍动物的 *anaeroplasmas* 和 *asteroleplasmas* 严格厌氧且对氧敏感，而其他柔膜纲大多是兼性厌氧。

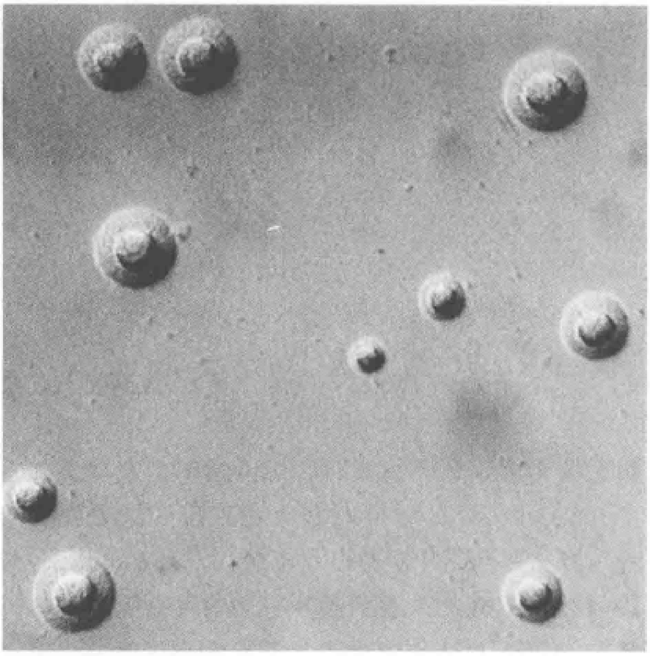


图 64-1 直径可达 110 μm 的人型支原体的油煎蛋样菌落。放大 132 倍

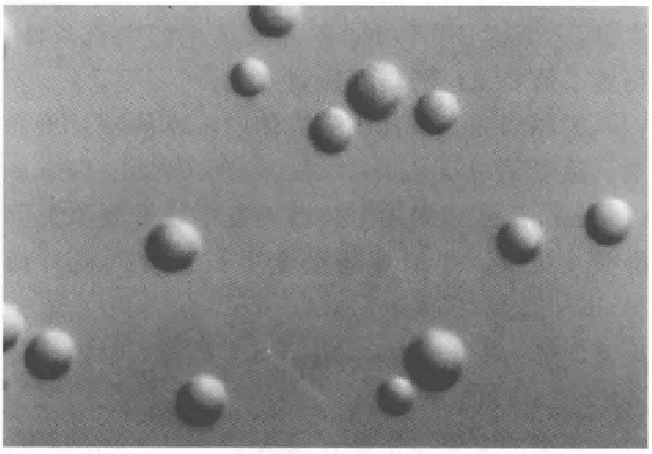


图 64-2 直径可达 100 μm 的肺炎支原体的球形支原体菌落。放大 126 倍

肺炎支原体(*M. pneumoniae*)定植和感染的前提是黏附于宿主呼吸道细胞。如在其他研究报道中所详述[5-6]，P1 黏附素和其他辅助蛋白介导的细胞黏附引起了慢性炎症反应和过氧化氢介导的细胞毒作用。肺炎支原体(*M. pneumoniae*)刺激 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞，诱导一系列自身抗体的产生，与宿主的各种组织和红细胞 I 型抗原反应，而红细胞 I 型抗原与冷凝集素的产生有关[6]。ADP-核糖基化毒素与百日咳毒素 S1 亚单位的序列具有显著的同源性，现在被称为社区获得性呼吸窘迫综合征(community-acquired respiratory distress syndrome，CARDS)毒素，该毒素已在肺炎支原体中发现并且引起培养的宿主细胞空泡化和纤毛停滞[7]。小鼠模型已经表明支气管肺泡灌洗液中 CARDS 毒素浓度与特定肺炎支原体菌株的定植、生长、复制、繁殖能力直接相关，并导致肺组织病理学改变。这种菌株间的差异性可以预测肺疾病患者病情的严重程度[8]。CARDS 毒素也被用作聚合酶链反应(PCR)的靶点或者血清学试验的抗原。生殖支原体(*M. genitalium*)具有一种终端结构，即 MgPa 黏附素，有助于其黏附于上皮细胞[9]。与肺炎支原体(*M. pneumoniae*)相比，脲原体和人型支原体中与黏附相关的因素尚未研究清楚，这些支原体缺乏明确的与黏附有关的细胞器。Henrich 等[10]研究认为，可变黏附相关抗原(variable-adherence-associated antigen，Vaa)是人型支原体(*M. hominis*)主要的黏附素，有助于人型支原体通过抗原变异逃避宿主免疫反应。脲原体也可通过细胞表面黏附蛋白的介导黏附于多种细胞。MB 抗原包含血清特异性和交叉反应的抗原表位，是人类脲原体感染过程中可持续检测的主要抗原[11]。尽管编码 IgA 蛋白酶的基因还没有在其基因组中被识别出来，但是脲原

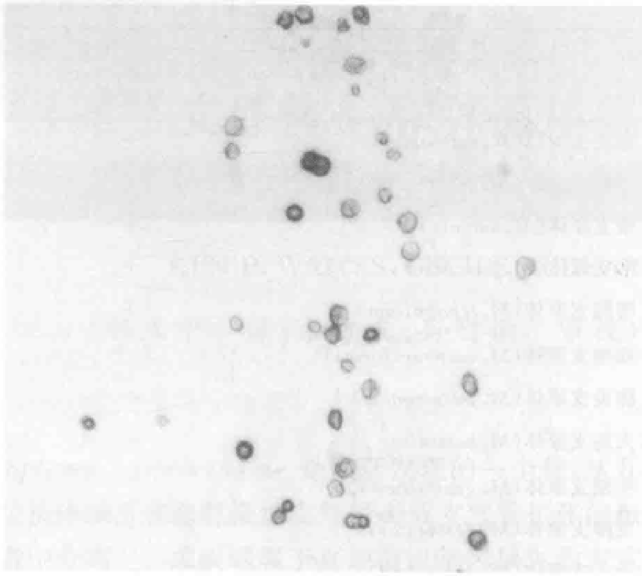


图 64-3 A8 琼脂上生长的来源于生殖道标本的直径为 15～60 μm 的脲原体某些种的颗粒状褐色脲酶阳性菌落。放大 1000 倍

体可产生IgA蛋白酶,并通过尿素水解作用释放氨气[11]。

三、流行病学及传播

柔膜纲常见于几乎所有的哺乳类及多种其他脊椎动物。虽然大多数柔膜纲有宿主特异性,但一些动物源性支原体和无胆甾原体(*Acholeplasmas*)却可存在于多种动物宿主中。柔膜纲中的螺原体属(*Spiroplasma*)、中间原体属(*Mesoplasma*)、虫原体属(*Entomoplasma*)及无胆甾原体(*Acholeplasmas*)能够寄生于昆虫及植物。

在人体内,支原体和脲原体与黏膜相关,主要存在于呼吸道及泌尿生殖道黏膜,很少穿透黏膜下层,但机体免疫力下降或者有侵入性操作时支原体和脲原体可能进入血液,播散至其他组织器官。很多柔膜纲在口腔及泌尿生殖道与宿主呈共生状态(表64-2),只在极少数情况下才引起侵袭性感染。通过培养及PCR检测发现,发酵支原体(*M. fermentans*)可存在于人体多个部位,如泌尿生殖道、咽喉部、下呼吸道及机体其他部位如关节等,但目前尚不完全清楚其主要定植部位和致病性[11]。虽然口腔共生支原体偶可进入下呼吸道并被培养出来,但只要鉴定方法正确,就不会与肺炎支原体相混淆。引起偶发感染的致病的种,如存在于健康男性和女性下泌尿生殖道的人型支原体及脲原体,使全面理解其致病性变得复杂。很多研究发现,一般在欧洲和美国,健康男性和女性下泌尿生殖道生殖支原体(*M. genitalium*)的检出阳性率为1.0%~3.3%,远低于人型支原体及脲原体[12-14]。其他种(表64-2)可在下泌尿生殖道中存在,但目前尚未发现与疾病相关。利用PCR技术检测发现,生殖支原体在患有尿道炎的男性泌尿生殖道和患有宫颈炎的女性泌尿生殖道频繁检出。尽管我们通常认为支原体为胞外微生物,但细胞内定植有利于发酵支原体(*M. fermentans*)、穿透支原体(*M. penetrans*)、生殖支原体(*M. genitalium*)人型支原体(*M. hominis*)及肺炎支原体(*M. pneumoniae*)生长[15]。这种细胞内定植可能是支原体逃避抗体和抗菌药物作用,使疾病慢性化和某些标本培养困难的原因。人型支原体及脲原体表面抗原的变异与它们在侵袭部位持续存在有关。支原体及脲原体在人群中能够通过直接接触传播,如生殖器—生殖器或口—生殖器性交传播。肺炎支原体可在出生时或在子宫内经呼吸道气溶胶或胎粪发生母婴垂直传播,甚至通过移植组织获得泌尿生殖道支原体的医院感染[1,16-17]。

四、临床意义

(一)呼吸道感染

20世纪60年代早期,人类首次鉴定并描述了肺炎支原体(*M. pneumoniae*),在一般人群中,4%~8%的社区获得性肺炎发生在地方性期间,20%~40%发生在流行性期间,而高达70%的肺炎发生在某些特定的人群中。长期以来,尽管肺炎支原体被认为与学龄儿童、青少年和中青年所患肺炎有关。但近年来,这种病菌已被证明可引起老年人及5岁以下儿童患病[6]。感染肺炎支原体最典型的临床表现为支气管炎,常伴有上呼吸道感染症状,如急性咽炎。约1/3的感染者可发展为肺炎,潜伏期一般为2~3周,家庭内传播较常见。最近有研究发现21%的无症状儿童上呼吸道携带肺炎支原体[18]。在初次感染后存在于呼吸道的时间可达数月,而低丙种球蛋白血症患者有时可达数年,原因可能是病原体紧紧地黏附或侵入上皮细胞。该疾病通常无季节性,症状不明显或轻微,但严重感染需要住院甚至死亡的病例也已有报道[6,19]。

肺炎支原体感染的肺外并发症包括脑膜炎、上行性麻痹、横断性脊髓炎、贝尔麻痹、心肌炎、心内膜炎心包炎、溶血性贫血、关节炎、肾小球疾病和皮肤黏膜损害。自身免疫性反应在肺外并发症中发挥一定的作用[6,20]。此外,已从脑脊液、心包液、滑膜液及其他肺外部位直接分离到肺炎支原体,有文献报道用PCR方法也检测到该病原体是直接侵袭的证据[20]。

仅凭临床特征不足以与其他常见细菌引起的肺部感染相区别,尤其是肺炎衣原体所致的感染。临床研究及动物模型实验表明肺炎支原体可能是支气管哮喘的病因,或是病情恶化的潜在原因。此外,临床研究表明肺炎支原体与疾病持续存在和加重有关[5-6,21-22]。

除了在一系列免疫缺陷、慢性支气管炎及支气管扩张患者的下呼吸道中,通过培养或PCR

法检出 *M. amphoriforme* 外，有关该病原体的资料很少[1]。其生化反应、菌落形态、生长特征，以及运动特征与肺炎支原体较为相似，但两者遗传学特征差异明显。反复分离到该病原体并且抗菌药物治疗后患者临床症状得以改善，表明其可能有致病性，不过需更多工作来判断其致病范围。迄今为止，除欧洲和日本以外，还没有发表过任何关于分离到 *M. amphoriforme* 的报道。然而，有一个记录完整但未发表的报告是从 1 例来自阿根廷的社区获得性肺炎患者中分离出一株*M. amphoriforme*。

(二)泌尿生殖道感染

在青春期后，许多性活跃的健康成人下生殖道中能分离到脲原体(*Ureaplasmas*)和人型支原体(*M. hominis*)。同时有证据表明，它们是与生殖道疾病有关的病原体。人和动物接种研究结果及免疫抑制患者观察表明脲原体是男性非衣原体、非淋球菌性尿道炎(nongonococcal urethritis，NGU)的病因[23]。自从 2 种不同的脲原体生物变种(生物变种 1 型和 2 型)被鉴定出来之后，多数研究认为生物变种 2 型与非淋球菌性尿道炎密切相关，而 1 型则无关[24-27]。许多研究试图将各种疾病与脲原体的某一血清型联系起来，但是最近有证据证实单一的血清型很少单独存在，并且在不同血清型之间会发生明显的基因水平传播，这使个体独特的血清型概念不再成立[24]。目前尚缺乏证据证实人型支原体是非淋球菌性尿道炎的病因。采用 PCR 技术检测发现，急性非淋病性尿道炎男性患者尿标本中生殖支原体(*M. genitalium*)检出率明显高于无尿道炎男性，提示生殖支原体是该病的病因之一[28]。通常，生殖支原体阳性患者尿道炎症状比沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)阳性患者更明显[29]。非衣原体和非淋病性尿道炎的男性生殖支原体感染率为 10% ～ 35%[14]。此外，30%的男性持续性尿道炎可能与生殖支原体有关[30]。在一些急性感染男性患者中，已检出抗体应答。该支原体也可导致灵长类动物(非人类)尿道炎[28]。PCR 证实由于这两个部位的直接入侵，生殖支原体也可能是尿道炎相关结膜炎的罕见病因[31]。尚无证据表明人型支原体是引起女性尿道症状的病原体，但脲原体可能与之有关[32]。

慢性无菌性前列腺炎患者前列腺活检标本中未曾培养出人型支原体和解脲脲原体(*Ureaplasmas urealyticum*)[33]，PCR 方法也极少检出生殖支原体[34]。然而，曾在一例非衣原体、非淋球菌性急性附睾-睾丸炎伴特异性抗体应答患者附睾分泌物中分离到脲原体[35]，这可能是该病不常见的病原体。脲原体产生脲酶，在体外尿中产生磷酸铵镁和磷酸钙结晶，在动物模型中形成结石。此外，感染性结石患者的脲原体检出率高于代谢性结石患者，提示该病原体可能与感染性结石有关[36]。人型支原体已从急性或慢性肾盂肾炎症状患者的膀胱尿和上尿路中分离出来，明显多于非感染性尿路疾病患者，常伴有抗体反应[37-39]。在一项研究中，80 例急性肾盂肾炎患者中有 7 例(8.8%)从上尿路中分离出人源性支原体，60 例非感染性尿路疾病患者中分离出 0 例(39 例)[39]。由于柔膜纲在肾病患者中很少被常规认为是感染源，所以还需要更多的研究数据来证实人源性支原体是上尿路疾病的病原体。尿道阻塞或器械检查是主要影响因素。而脲原体与此不同。

柔膜纲不引起阴道炎，但在细菌性阴道病患者中与其他病原体一起增殖。有研究表明，人型支原体促进细菌性阴道病的发生[40]，但尚无证据表明脲原体与细菌性阴道病有关[11,23]。虽有研究显示生殖支原体与细菌性阴道病有关，但也有无关的报道[13]，因此，对它是否为此病的独立因素仍存在争议[40-41]。细菌性阴道病与宫颈炎、子宫内膜炎、输卵管炎和输卵管因子不孕有关[42]，约有 10% 的经腹腔镜诊断的输卵管炎患者在子宫内膜和输卵管分离到人型支原体，并伴特异性抗体应答[43]。此支原体对混合感染患者的临床意义难以评价。但是，血清学试验证实人型支原体是输卵管型不孕症的独立危险因素[44]。脲原体可直接从感染的输卵管中检出，但未在纯培养中分离出。此外，将此因素和其他因素如血清学试验阴性、灵长类动物(非人类)试验，以及输卵管接种试验结果综合进行考虑，不支持脲原体与是盆腔炎(pelvic inflammatory disease，PID)的唯一病原体[23]的因果关系。但是生殖支原体与子宫颈炎[41,45-46]和子宫内膜炎[47]有着密切的联系，这提示它在 PID 中起重要作用。最近的一项 meta 分析[48]发现，生殖支原体与子宫颈炎和盆腔炎之间存在显著的相关性。此外，血清学和直接证据也表明生

殖支原体与输卵管不孕风险的增加有关[48]。目前脲原体可能致不孕仅是推测。

在横向和纵向研究中，发现了生殖支原体和艾滋病病毒感染之间的联系。生殖支原体在 HIV 阳性的同性恋男性的尿道和直肠部位都比 HIV 阴性的男性更常见[49]，而生殖支原体引起的宫颈炎[50]在 HIV 阳性的女性中比在 HIV 阴性的女性中更常见。携带大量生殖支原体的女性比不携带生殖支原体的女性更容易感染 HIV-1，这与支原体刺激 HIV 复制的能力相一致[51]，并可能增强病毒的传播。生殖支原体和 HIV 感染之间的显著正相关也得到了 meta 分析结果的强有力的支持[52]。

自发性流产胚胎、死胎及早产儿脏器中，脲原体分离率高于引产或者足月产婴儿[11]。一些血清学和治疗研究结果也支持支原体对胎儿发病率有影响[11]。在研究脲原体与绒毛羊膜疾病和低体重婴儿之间的关系时，必须考虑到细菌性阴道病可能是一个混杂因素。胎膜中的脲原体与炎症有直接联系，并可能在妊娠早期出现完整胎膜时入侵羊膜囊，导致持续感染和不良妊娠[53]。

大约从 10%产后发热妇女的血标本中可分离到人型支原体，而在流产但不发热和正常分娩产妇中未分离到[23]。此外，大约半数发热的流产妇女可检出抗体，而无发热者极少检出[23]。因此，人型支原体可引起一些流产后或正常分娩后的妇女发热。对脲原体也有类似的报道，脲原体可能与数例产后子宫内膜炎有关[54]。在恒河猴动物研究中发现，无胆甾脲原体(*U. parvum*)及人型支原体能使诱导羊水白细胞浸润，上调前炎性细胞因子、前列腺素、金属蛋白酶类及子宫活跃，导致绒毛膜炎，全身性胎儿炎症反应、早产及胎儿肺损伤[55]。但目前很难确定该病原体是导致细菌性阴道病的独立危险因素。此外，关于解脲脲原体(*U. urealyticum*)和无胆甾脲原体在早产中的作用尚存在争议。虽然与妊娠相关的资料较少，但生殖支原体与早产和自然流产有关[48]。

(三)新生儿感染

在分娩或妊娠早期，生殖道的支原体可经由母体下生殖道上行而定植于婴儿，但可能是一过性并没有后遗症。由感染的母亲传染给婴儿的垂直传播率为 18%～55%[11]。在自然分娩的婴儿和剖宫产的婴儿中，均可分离到脲原体和人型支原体[11]。极低体重儿的脲原体下呼吸道感染，可发生先天性肺炎、菌血症，由于炎性细胞因子在气管内浸润进而发展成慢性肺病，甚至死亡[11]。有人对 20 世纪 80 年代起发表的相关文献做了 meta 分析，分析结果支持脲原体感染与慢性肺病的发展有关，但到目前为止，还没有证据支持用红霉素治疗早产儿感染可以降低慢性肺病的发病率和病死率[56]。已从妊娠妇女血、脐血及新生儿血液中分离到人型支原体和脲原体，这两种支原体也可侵入新生儿脑脊液[11]。出现轻微的、亚临床的无后遗症脑膜炎或永久性的神经损害。支原体在健康足月儿出生 3 个月后定植率下降。儿童和没有性经历成人的生殖道的支原体定植率低于 10%[11]。

鉴于许多健康新生儿存在生殖道支原体定植而不致病，因此，新生儿常规筛查生殖道支原体缺乏临床价值。但若有临床指征、影像学或实验室证据支持肺炎、脑膜炎，尤其是没有明显的其他病原体感染的早产儿，应考虑人型支原体或脲原体感染，以及根据临床情况，对呼吸道分泌物和(或)脑脊液进行培养或 PCR 检测。

(四)全身性感染和免疫抑制宿主

肺外和生殖器外支原体感染可能比目前所认识的更常发生。人型支原体是唯一偶尔在常规细菌培养中可以检出的人源性致病性支原体。所以，许多病例是偶然发现的，并非因怀疑支原体感染而做的针对性检测而发现。大量报道显示，当怀疑感染而培养未检出常见微生物时，借助于通用 PCR 引物和 DNA 测序技术发现，支原体及脲原体可引起免疫功能正常或受损人群的各种全身感染，且逐年增加。柔膜纲在免疫抑制患者，尤其是低丙种球蛋白血症患者中，可通过生殖道和呼吸道播散，引起侵袭性关节病。先天性抗体缺陷者化脓性关节炎诊断应始终优先考虑柔膜纲感染。人型支原体菌血症发生于肾移植、创伤和泌尿生殖系统手术后，脑脓肿、骨髓炎病变和伤口感染患者可检出人型支原体[57-58]。尽管这些支原体与疾病间的关系尚不明确，但是通过 PCR 方法在类风湿关节炎和其他关节炎患者关节滑膜液中都可以检出各种支原体[59-61]。几年前，发酵支原体和其他支原体可能是海湾战争综合征的病原体的

观点受到了极大的关注,但目前还没有可信的证据证实它们与此病相关或为病原体[62]。已被证实的是,在接受肺移植的免疫抑制患者中,脲原体可引起全身性感染,甚至是致命的感染,可导致高氨血症[63]。偶尔有报告称,口腔共体支原体感染,如唾液支原体或口腔支原体感染,以及多种动物源性感染,可导致各种类型免疫缺陷患者的人畜共患感染。通常,这些感染只有在广泛寻找其他病原体失败并提交标本进行支原体培养或分子生物学方法检测以帮助诊断之后才能发现。

五、标本的采集、运输和储存

(一)标本类型和采集

根据临床表现和待测病原体,采集体液用于支原体培养和非培养检测,包括血液、滑膜液、羊水、脑脊液、尿及前列腺分泌物、精液、伤口分泌物、痰、胸腔积液、支气管肺泡灌洗液或其他支气管分泌物。此外,鼻咽、咽喉、子宫颈/阴道、伤口和尿道拭子标本也可接受。通过活检或尸检得到的组织,包括胎盘、子宫内膜、骨碎片和尿道结石也可用于检测。由于支原体紧密黏附于人体细胞,因此当采集拭子标本时,必须小心地在采样部位用力刮取以尽可能获得更多细胞。采用PCR方法检测苛养支原体如生殖支原体时,男性患者的尿标本有时比尿道拭子标本更敏感[64]。如需要确认泌尿生殖道局部支原体的存在,可收集排尿过程中或前列腺按摩后各期尿。应避免妇科检查常用的润滑液或防腐剂污染标本。拭子应优先选择带有铝或塑料柄的涤纶材质。应避免使用木质柄棉拭子,因其有潜在的抑菌作用。在标本运送到实验室之前,拭子要从标本中拿出。

尽可能多地采集血液标本(成人至少10 ml),并将无抗凝剂血液床边按1∶5到1∶10的比例接种到支原体液体培养基中,可成功分离支原体。大多数商品化血培养基中的多聚茴香脑磺酸钠和抗凝剂,可抑制支原体生长,但加入1%明胶可减少其抑菌效果[65]。无论是否使用自动化血培养仪,都不推荐商品化血培养瓶用于支原体检测。因为即使在培养瓶中添加代谢底物和明胶,持续监测、非放射性检测的自动化血培养系统不会识别含人型支原体的培养瓶,而人型支原体可以在血培养瓶中存活数日[66]。

(二)运输和保存

支原体对不利的环境极其敏感,尤其是干燥和高温。应尽可能床边接种并选择合适的运送和(或)生长培养基。支原体专用液体生长培养基,如商品化培养基SP4或10B肉汤(Thermo Fisher, Waltham, MA,或者Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA)可作为运送培养基;2 SP[含0.2 mol/L蔗糖的10%(体积分数)灭活的小牛血清溶于0.02 mmol/L的磷酸缓冲液,pH 7.2]和含0.5%(体积分数)牛血清白蛋白的胰蛋白胨肉汤也可作为运送培养基。专用液体运送培养基,如A3B(Thermo Fisher)缺乏其他培养基所包含的部分生长添加剂,延缓脲原体产生尿素导致培养基pH升高,从而减少运输过程中对病原体的毒性。实验室可以选择购买通用运送培养基运送支原体、脲原体、衣原体和病毒。大多数通用运送培养基含有抑制剂,防止非无菌部位正常菌群中细菌和真菌的过度生长。M4、M5和M6(Thermo Fisher), UTM(Copan Diagnostics, Murrieta, CA)和BD UVT培养基(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)是常用的适合支原体和(或)脲原体培养的通用运送培养基。

如果能在1 h内完成接种并防止标本蒸发,液体标本无需专门的运送培养基。组织标本应放在无菌且能盖紧的容器中,立即送到实验室。若无法尽快接种,应将组织标本存放在运送培养基中。对不能立即运送到实验室的标本,应置于冰箱保存。如果标本必须经过转运和(或)接种培养基前保存时间可能超过24 h,需要将装有标本的运送培养基置于−80℃冻存,以防止活力丧失和减缓细菌过度生长。在−80℃或液氮环境中,柔膜纲在合适的生长或运送培养基中可长期保存。如有必要,可使用干冰将冷冻保存的标本邮寄至参考实验室。即便是非培养的检测方法,−20℃保存也不利于标本的检测。冻存标本应在37℃水浴快速解冻后进行检测。

六、直接检查

(一)显微镜检查

与衣原体和立克次体一样,无法用常规光学显微镜清楚地观察支原体。支原体缺乏细胞壁,

革兰染液不能着色，但染色步骤有利于排除污染的细菌。人型支原体偶尔在细菌培养基(比如哥伦比亚琼脂)生长针尖样小菌落，但革兰染色不着色，提示这些小菌落可能是支原体，需要进一步进行特异性检测和转种至支原体培养基。DNA荧光染色和吖啶橙染色可以用于体液标本中支原体的辅助检测，但不具有特异性。

(二)抗原检测

尽管对于易于快速从临床标本中分离的支原体(如人型支原体和脲原体)培养的方法是合适的。但对那些苛养和(或)生长缓慢的支原体，如生殖支原体和肺炎支原体，培养不是理想的检测方法。因此，尽管可以尝试培养的方法，但应使用可以替代培养的非培养方法进行检测。肺炎支原体抗原快速检测方法始于20世纪80年代，但因其敏感性低，且与其他共生支原体存在交叉反应，而发展受阻。这种快速诊断的方法现已被摒弃，取而代之的是核酸扩增试验(NAATs)。

(三)核酸检测

20世纪80年代初，以16S rRNA基因为靶点的DNA杂交技术被用于诊断肺炎支原体感染。由于这些探针相对不敏感，PCR等扩增技术已经将之取代。核酸扩增试验(NAATs)已用于检测所有可以感染人类的有临床意义的支原体，这主要是因为它优于培养和血清学方法，例如，可以在1天内完成单个标本中不一定存活病原体的检测，也可以检测贮藏组织中的核酸。NAATs比血清学试验可以在疾病的更早期检测到病原体，因为抗体需要随着病程的发展(可能是几天或者数天)逐渐增多才能达到可测浓度。实时荧光定量PCR是目前首选的检测支原体和脲原体的PCR法，其优点包括更快的周转时间，更少的PCR产物处理步骤，以及比传统PCR技术更好的诊断敏感性[67]。实时荧光定量PCR的分析敏感性一般很高，当使用纯化的DNA时，有些技术能够检出单个病原体。最近的一篇综述深度讨论了各种NAATs及其在检测支原体和脲原体中的应用[67-68]。

临床标本中用PCR检测肺炎支原体的靶基因包括16S rRNA、P1、*tuf*、*parE*、*dnak*、*pdhA*、ATP酶操纵子、CARDS毒力基因(*mpn*372)，以及非编码重复元件*repMp*1[5,69-73]。常规和实时以核酸序列为基础的扩增(NASBA)均已被用于肺炎支原体RNA的检测[74]。NASBA可以快速获得敏感性与PCR一样高的结果，检测阈值低至5～50 CFU[74-75]。目前极少有一对一的对比研究用以确定某种检测方法或靶基因是否比另一个更好。很多研究以培养和血清学作为参考方法，评价PCR，得出了迥然不同的结果。在过去10年中，欧洲已经有了一些商用的单一或多重的核酸扩增试验，用于单独或与其他呼吸道细菌或病毒联合检测肺炎支原体，其他产品仍在开发中[68]。有限的评价表明，商用的核酸扩增试验的作用可与非商业检测相媲美[76-78]。

近年来，美国FDA已经批准了至少4种不同的分子体系用于临床标本中肺炎支原体的单一分析或多重分析。①NxTAG呼吸道病原体小组(LuminexMolecular Diagnostics, Inc., Toronto, ON, Canada)包括几种病毒，肺炎链球菌(*M. pneumoniae*)和肺炎链球菌(*C. pneumoniae*)。多达96个提取样品可以通过多重PCR和珠子杂交进行分析，并在MAGPIX仪器上读取结果。②BioFire Diagnostics(盐湖城，UT) FilmArray RP还可以检测鼻咽拭子中几种病毒和细菌呼吸道病原体的核酸，包括肺炎支原体。更新的FilmArray RPEZ是临床实验室改进修正案(Clinical Laboratory Improvement Amendment, CLIA)的豁免版本，用于测试14种呼吸道病毒和细菌性病原体，包括肺炎支原体，并被设计在FilmArray 2.0系统的单计算机或单仪器配置上运行。③GenMark ePlex RP(genmarkeplex RP, GenMarkDx, Carlsbad, CA)与BioFire一样，将提取、扩增和检测结合在一个用于检测呼吸道病毒和包括肺炎支原体和支原体在内的细菌的复合系统中。④Meridian Bioscience公司(Cincinnati, OH)的Illumigene支原体分析系统是一种循环介导的等温扩增分析，可以很容易地纳入无分子诊断设施的临床微生物实验室，并已证明，与培养相比，它可以产生可接受的结果[79]。这种相对简单、低成本、单分析的快速检测系统是目前用于门诊中检测肺炎支原体的真正的即时检验最接近的系统。这些商用的核酸扩增实验都没有经过大量的评估，也没有与其他检测方法或其他方法进行比较。

一些基于实时荧光定量 PCR 或转录介导扩增的核酸扩增试验已被用于生殖支原体的分子检测。将操纵子(如 MgPa 操纵子),16S rRNA,115 KDa 的蛋白编码的基因和编码 3-磷酸甘油醛脱氢酶的 *gap* 基因[80-86]为目标检测生殖支原体,目前,美国没有 FDA 批准的用于检测生殖支原体的商业试剂盒;然而,有些正在开发中。一些公司已经商业化了 CE 标记的多重 PCR,供欧洲使用的用于检测包括生殖支原体性传播病原体[87-89]。Hologic 公司(Marlborough, MA)开发了一种研究专用的检测生殖支原体的作为 PCR 替代方法的转录介导扩增法[90-92]。最近欧洲已经商业化了 Aptima 体外诊断支原体生殖道检测,可在美洲豹平台上使用。针对人型支原体的 PCR 检测通常以 16S rRNA 为靶基因[93-94]。有文献报道人型支原体 16S rRNA 基因出现了异质性变化[95],目前已开始用其他的靶基因包括 *gap*、*fstY* 和 *yidC* 进行检测[96-99]。

PCR 可以用于脲原体检测及菌种鉴别。基于凝胶的常规 PCR 方法检测的序列包括 16S rRNA 和 16S rRNA～23S rRNA 基因间隔区、脲酶基因和 *mba* 基因[100-108],而实时荧光定量 PCR 方法主要检测的是脲酶基因及其亚单位或 *mba* 基因[85,99,109-113]。UAB 支原体诊断实验室(The University of Alabama at Birmingham Diagnostic Mycoplasma Laboratory)用实时荧光定量 PCR 检测 UU063 基因来鉴定和鉴别脲原体的某些种,UU063 基因编码一个保守的假定蛋白,此蛋白在所有 4 种血清型的微小脲原体上都是相同的。该基因也编码一个长度为 15 072 bp 的可读框(open reading frame, ORF)(UUR10_0680),ORF 在所有 10 种脲原体的血清型中都是保守的(>99.97%)[110]。实验室内的方法学评估表明,这种 PCR 检测比以脲酶为靶基因的常规 PCR 阳性率更高。有些分子检测包括脲原体的检测在许多欧洲国家已经有商品化的试剂盒,但在美国尚无[68]。Seegene 公司(Rockville, MD, USA)有 STD6 和 STD6B ACE 检测的商品化试剂,可以同时检测子宫颈/尿道拭子标本中的阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)、人型支原体、生殖支原体、沙眼衣原体、淋病奈瑟菌和脲原体。

以肺炎支原体检测为例,用培养和(或)血清学方法与 PCR 技术作比较,最终的检测结果并非完全一致。在早期肺炎支原体感染的诊断中,PCR 比血清学更敏感[114]。但是,核酸扩增试验不能区分无症状携带和急性症状感染。PCR 检测为阳性而培养阴性的患者无呼吸系统疾病,可能意味着 PCR 特异性不够,或感染后病原体持续存在,或是无症状携带者。PCR 阳性而血清学阴性,可能是机体免疫应答不足,或标本在特定抗体尚未形成时采集的。PCR 阴性,培养或血清学阳性,则很可能是在 PCR 检测过程中抑制剂的干扰或其他技术问题。在培养和(或)血清学试验结果为阴性时,用不同靶基因的二次 PCR 检测有利于结果的解释和解决这些差异尤为重要。如果已经进行了抗支原体药物治疗,即使血清学结果为阳性,PCR 结果也可能是阴性。有证据表明,用 PCR 法检测肺炎支原体时,鼻咽标本比咽拭子更常发生抑制现象[115]。现有的核酸纯化商品试剂盒有助于减少 PCR 的抑制现象。

PCR 技术对于生长较快、较易培养的支原体(如人型支原体和脲原体)比生长缓慢和更苛养的菌种(如肺炎支原体和生殖支原体)而言更有常规诊断的价值。然而,PCR 技术在诊断由人支原体和脲原体引起的上生殖器官感染和生殖器外感染方面有价值,因为它可以检测到少量的微生物。

实时荧光定量 PCR 对于培养获得的未知支原体是非常好的鉴定方法,并取代了以前繁琐的生化和免疫学方法。目前,在美国,虽然各参比实验室的 PCR 方法正成为肺炎支原体、生殖支原体的诊断方法,但由于此法过于复杂而没有在大多数医院的微生物实验室常规开展。一旦商品化的快速检测方法越来越多,支原体的分子检测技术也会越来越广泛。

七、分离步骤

(一)生物安全注意事项

肺炎支原体、人型支原体和脲原体都是生物安全二级病原体。当处理这些微生物和其他人源性支原体时,应在实验室的工作台和(或)2 级生物安全柜内进行。

(二)增菌培养基和接种

对人类致病的支原体的生长需要血清、生长因子(如酵母提取物)和代谢底物。由于不同的支

原体具有不同的特征，有不同的最适 pH 和底物需求，所以，没有一种单一配方的培养基适用于所有的支原体。总的来说，SP4 肉汤和琼脂（pH 7.5）是用于培养肺炎支原体最好的培养基，加入精氨酸也是培养人型支原体最好的培养基。Shepard 的 10B 肉汤（pH 6.0）是可用作人型支原体和脲原体的培养基，A8 也可作为这两种支原体的固体培养基。培养基中加入青霉素 G 和广谱 β-内酰胺类抗菌药物以抑制细菌的生长。由于支原体细胞微小，通常在液体培养基不产生浑浊，所以添加 pH 指示剂（如酚红）对于检测其生长非常重要。这些培养基的成分见参考文献[116]。

对于自制培养基，对每一种主要成分的质量控制都很重要。质量控制措施必须包括将支原体接种在只是成分不同的两种培养基中进行定量生长试验。新批次的肉汤培养基中支原体的生长数量是参考批次肉汤培养基 10 倍的稀释倍数以内，那么就可以认为这批新培养基是符合要求的。琼脂平板上生长的菌落至少达到参考培养基的 90% 以上是理想的。使用购买的培养基成分如马血清，必须是使用前做无菌试验。如果某参考实验室要进行支原体检测，需要查明所用的培养基是否是自制的，还是购自质量控制有保证的厂商。质控菌株应该包括模式菌株和传代次数较少的临床分离株；当检测脲原体时，推荐检测两个菌种中每一种至少一个血清型。检测培养基中的抑制剂成分是有价值的，因为抑制剂可抑制非无菌部位的其他微生物的生长，防止因污染菌过度生长而使支原体分离失败。

在接种到培养基之前，通常要先把标本充分混匀。液体标本应先离心（600×g，15 min），接种沉淀物。如果怀疑尿标本被污染，应用 0.45 μm 滤膜过滤。此外，组织标本在用肉汤稀释前应先切碎，但不可研磨，防止组织中可能释放支原体的抑制剂[117]。标本要在肉汤中连续稀释到至少 10^{-3} CFU，每个稀释度都要在琼脂上进行传代培养，稀释是培养过程中非常重要的步骤，因为这可以帮助消除抗菌药物、抗体和其他抑制剂（包括存在于临床标本中的其他细菌）的干扰。省去这一重要的稀释步骤也是一些实验室难以培养到支原体的原因之一。稀释也有助于解决培养病原体的能力急剧下降的问题（常见于脲原体），同时也有助于计算标本中病原体的数量。

（三）孵育条件和传代培养

肉汤应在空气条件下 37 ℃孵育，琼脂平板在 5%～10% 二氧化碳气体环境中或 95% 氮气加上 5% 二氧化碳厌氧环境中生长最佳。如果无专用培养箱，含有 GasPak 催化剂的厌氧罐也可用于支原体培养。人型支原体和脲原体生长速度相对较快，阳性多数可在 2～4 天可以得以鉴定，而肺炎支原体通常需要 21 天甚至更久。几种支原体的生化反应相似，只有通过特异性试验才能鉴定到种。所有颜色发生改变的肉汤应传代接种到新鲜肉汤管（0.1 ml 菌液＋0.9 ml 培养液）和琼脂培养基（0.02 ml 菌液）。颜色发生改变之后应立即转种，尤其是脲原体，因为几个小时内培养物就会失活。传代培养也能提高诊断阳性率，因为在最初的接种标本的固体培养基上，某些菌株可能未充分生长。培养期间进行周期性盲转，可提高肺炎支原体和其他支原体的检出率，因为有时候支原体生长但培养基的颜色改变并不明显。标本应至少培养 7 天，才能诊断为生殖支原体阴性，至少培养 6 周，才能诊断为肺炎支原体阴性。发酵支原体的生长速度与肺炎支原体相似，生殖支原体很少在临床标本的无菌培养基中培养出。为了获得最好的结果，最好尝试在琼脂上培养微生物之前，在 Vero 细胞中加入一个细胞培养步骤[28]。但对于发酵支原体、生殖支原体和除了肺炎支原体、人型支原体和脲原体以外的其他人源性支原体而言，培养条件尚未很好地建立。由于 PCR 方法已经应用于研究和参考实验室，改善那些生长缓慢和难以培养支原体的培养技术就没有先前那样重要了，关于它们的培养方法在此不作讨论。

（四）菌落生长

当进行肉汤培养时，由于脲原体在培养基中很快死亡，应每天 2 次、连续 7 天观察培养液由尿素水解引起的颜色变化。支原体则无需这样严格，肉汤每天观察 1 次即可。脲原体琼脂平板培养基，应每天用相差显微镜放大 20～60 倍进行观察；人型支原体每隔 1～3 天观察一次；肺炎支原体和其他生长缓慢的支原体，每 3～5 天观察一次。脲原体在 A8 培养基上的菌落（图 62-3）可根据产生的脲酶使培养基中的氯化钙指示剂发生变化进行鉴定。人型支原体菌落较大，常呈典型的

油煎蛋样，脲酶阴性(图 62-1)。其他支原体，如肺炎支原体和生殖支原体，可有非常小的球形菌落，可呈或不呈油煎蛋样(图 62-2)。当不确定琼脂平板上是否有支原体菌落时，将亚甲蓝染液直接滴在平板上有助于判断，支原体菌落可被染成蓝色。人型支原体是唯一能在普通细菌培养基如巧克力平板和血平板上生长的对人有致病性的支原体。然而，针尖样半透明的菌落很容易被忽略，常规的细菌培养很可能在人型支原体生长所需的时间(4天甚至更长)到达之前，培养基就已经被丢弃了。因此，当出现可疑菌落时，要在适宜支原体生长的培养基上进行传代培养。

(五)商品化培养基和培养试剂盒

为了满足日益增多的独立实验室或医院临床实验室开展支原体床边接种的需求，许多公司研发了运送和生长培养基。在欧洲，已有许多试剂盒用于泌尿生殖系统标本的脲原体和人型支原体检测、定量、鉴定和抗菌药物敏感试验。Wescor公司(Logan，UT)的两类产品 Mycoscreen Plus 和 Mycofast US 目前正在美国使用。标本应放置于液体运送培养基，再接种到含有特定的干燥或冻干的底物和抑制剂的试剂板条孔中。支原体的鉴定和定量基于含有特殊底物和抗菌药物抑制剂在孔内颜色变化。

一些试剂盒和其他商业化产品及培养基已在许多国家销售，并经过不同研究者的评估[68,118-119]。商品化产品和试剂盒对那些不专门从事柔膜细菌检测，却偶尔要开展检测的实验室具有特殊价值，但是使用者应该清楚，现有产品具有一定的局限性。使用商品化培养基时，需要进行室内质量控制。

八、鉴定

尽管可从人体分离到许多大菌落支原体，但不能根据菌落形态或特殊的生化表型进行鉴定。标本来源和生长速度，结合生化特点可以为鉴定提供一些线索。生化特点，如对葡萄糖、精氨酸和尿素的利用，都是基于在合适的肉汤中不产生浑浊时的颜色改变进行判断的。支原体在 SP4 培养液中利用葡萄糖产生酸性改变(红色变成黄色)，而利用精氨酸使肉汤颜色在以酚红为 pH 指示剂时从红色变成深红色。10B 肉汤中支原体对尿素和精氨酸的利用导致碱性改变，颜色从橙色变成深红色。因此，分离自呼吸道，生长缓慢，分解糖，培养 5～20 天后在 SP4 培养基上呈球形菌落，在有豚鼠红细胞培养基上表现为溶血活性和红细胞吸附现象的病原体，很可能是肺炎支原体。口腔共生支原体可以单独存在或与肺炎支原体同时存在，在 SP4 培养基中发生碱性改变(颜色由粉红色变成深红色)，在琼脂培养基上呈“油煎蛋”样菌落。在含有尿素的 10B 肉汤中过夜培养，不出现浑浊，但出现碱性颜色改变，极有可能是脲原体。而在含有精氨酸的肉汤中，泌尿生殖道标本在 24～72 h 内产生碱性反应的，很有可能是人型支原体。对含有尿素的琼脂和 $CaCl_2$ 等指示剂进行菌落形态检查，就足以鉴定出脲原体。利用菌落形态鉴定脲原体很有用，但要注意它常与人型支原体共存于泌尿生殖道标本中。

许多技术可将大菌落支原体鉴定至种的水平。由于这些技术较为复杂，缺少商品化试剂盒，因此，更适用于参考实验室，而不是医院的微生物实验室。PCR 比其他方法操作更简单，而且不需要一些无法获得的免疫试剂，是支原体最好的鉴定方法。PCR 法对结果的解释也没有一些旧方法(如免疫荧光法)那么主观。Pereyre 及其同事现已将基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry，MALDI-TOF MS)用作识别细菌物种的一种新兴替代方法，现已应用于人类软体动物的识别和亚型分析[120]。继肉汤培养和蛋白提取之后，MALDI-TOF MS 被证明可以准确地识别大多数人类物种，包括肺炎支原体、人型支原体和脲原体，并将肺炎支原体根据黏附素 P1 型进行分类。然而，MALDI-TOF MS 质谱鉴定需要 30 ml 和 100 ml 的肺炎支原体和脲原体培养基，这限制了其常规应用。

九、分型系统

已有对几种柔膜纲分型方法的描述，并用于肺炎支原体流行病学研究和脲原体 14 种血清型不同致病性的研究。由于多种交叉反应的发生，以及许多人无论是否发病，其泌尿生殖道内可同时存在不止一种血清型，加之研究方法低效且精确度不高，导致早期对脲原体的研究结果不一致。

单克隆抗体的发展让脲原体血清型分型中细胞表面特异存在的多重抗原的鉴定更加可靠。基于PCR方法使得脲原体两个基因群的特征更精准，从而能将其分成2个独立的种。脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis，PFGE)已用于确定脲原体基因组的大小，这项技术可以区分脲原体14个血清型中的绝大多数，并检测血清型间的差异[121-123]。最近发现，脲原体血清型间存在广泛的基因水平传播，且血清水平与疾病状态无关联性，因此，血清分型不推荐用于诊断目的[24]。

限制性片段长度多态性、多位点可变数量串联重复序列分析(multiple-locus variable-number tandem repeat analysis，MLVA)、多位点序列分型(multi-locus sequence typing，MLST)，采用SNaPshot技术的单核苷酸多态性基因分型免疫印迹法、双向凝胶电泳和PCR方法都已用于描述肺炎支原体临床菌株的特征[124-130]。通过对P1黏附素基因、ORF6基因、P65基因和典型的DNA限制性酶切片段进行分析，大部分评估认为支原体有两个主要的基因群或亚型。MLVA是目前用于肺炎支原体分型最具鉴别性和最常用的方法，已确定了50多种MLVA类型，并提出了解释MLVA分型的指南[131]。MLST也用作脲原体的分型[132]。MLVA和MLST已被开发用于人型支原体[133-134]，而生殖支原体基因分型主要基于*mgpB*黏附素基因的单核苷酸多态性分析[135]。除了专门的研究机构和参考实验室，其他实验室通常不具有对人源性支原体和脲原体流行病学研究的分型设备。

十、血清学试验

(一)肺炎支原体呼吸道疾病

长期以来，血清学方法一直是诊断肺炎支原体所致呼吸道感染最常用的实验室检测方法。尽管培养和PCR方法也可用于呼吸道标本肺炎支原体的检测，但由于急性感染后病原菌在体内滞留时间长短不一，如没有其他的确证试验，如血清转化试验，很难评价培养和PCR阳性结果的意义。

肺炎支原体含有脂质和蛋白抗原，能诱导感染者的抗体应答。感染约1周后即可检出，3～6周达高峰，之后逐渐下降。可通过几种基于不同的抗原和技术的不同的血清学方法进行检测。当支原体感染性疾病发生率增高时，血清学方法是一种非常有用的流行病学工具，但不太适用于单个患者的即时检测。其主要缺点是需要在急性期和恢复期，间隔2～3周采集双份血清，同时检测IgM和IgG以证实血清转变。此方法对40岁以上成人尤为重要，因为这些人可能由于再感染致IgM抗体达不到峰值[136]。而且，IgM有时可存在数周至数月，仅凭检测IgM难以判断急性感染[136]。在一些感染者中，免疫抑制患者抗体产生延迟，甚至不产生抗体。如果在发病后过早采集血清可能出现IgM假阴性的结果。由于肺炎支原体是黏膜致病病原体，IgA通常是感染早期产生的抗体，可以快速升高和降低，因此它可能是急性感染较好的诊断指标，但很少有商业化的试剂盒包含IgA的检测。表64-3列举了在美国使用的一些检测肺炎支原体感染的血清学方法。

补体结合试验(complement fixation，CF)曾是肺炎支原体主要的血清学试验方法，主要检测早期IgM应答，在较小程度上，IgG检测不能分辨抗体类别。现已知该试验与其他病原体尤其是生殖支原体存在交叉反应。由于其他无关病因所致的急性炎症也可诱导机体产生具有交叉反应的自身抗体，从而产生假阳性结果。大多数临床实验室已采用其他方法替代补体结合试验。

免疫荧光抗体法(immunofluorescent antibody，IFA)、直接和间接IgM捕获血凝法、颗粒凝集法(particle agglutination antibody assays，PAs)也用于检测肺炎支原体抗体[137-139]。免疫荧光法使用肺炎支原体抗原包被的荧光载玻片，分别检测IgM和IgG。免疫荧光法操作简便，但结果解释带有主观性，需要荧光显微镜，同时肺炎支原体特异性IgG抗体的存在可能干扰IgM的结果。定性和半定量PAs通过乳胶颗粒或明胶同时检测IgM和IgG，操作简便，但不比酶标法(enzyme immunoassays，EIAs)更有优势。PAs操作简便，已在部分国家普遍使用，但在美国并未广泛用于肺炎支原体感染的血清学诊断。

酶标法出现于20世纪70年代，已成为美国最常用的肺炎支原体抗体检测方法。根据CLIA，该方法被归类为中度或高度复杂性，可以是定性或定量试验，有些需要特殊的仪器设备。酶标法比补体结合试验或培养法更敏感，且检测所需的血清量非常少。由于此法需要采集急性期和恢复

表 64-3 在美国销售的肺炎支原体血清抗体检测试剂盒举例[a]

产品名称	制造商	检测抗体	检测方法和描述	测试数/盒	样本检测能力	检测时间(min)	
						全程	手动
肺炎支原体抗体(MP)检测系统	Zeus Scientific Inc, Branchburs, NJ	IgM 和 IgG 分开	间接免疫荧光法，肺炎支原体抗原基质悬浮液或包被肺炎支原体克隆的 Crown Titre 显微镜载玻片	100	每片 10 孔	2.5 h	30
免疫金卡	Meridian Bioscience, Cincinnati, OH	仅 IgM	定性酶标法，单样本卡由膜上包被肺炎支原体抗原的测试带和固定了人 IgM 的质控带组成	30	每卡一个标本	12	10
肺炎支原体 IgG/IgM 抗体检测	Thermo Fisher (Remel), Lenexa, KS	IgM 和 IgG 同时	基于膜的定性酶标法，测试单个样本的酶免疫结合试验，包被有灭活的肺炎支原体黏着素蛋白	10 或 40	每卡一个标本	10	2~3
支原体 IgG 和 IgM ELISA 检测	Zeus Scientific Inc, Branchburs, NJ	IgM 和 IgG 分开	定性酶标法，在可拆分的多孔板中包被部分纯化的灭活肺炎支原体	96	每条 8 孔	50	5~10
Immuno WELL	GenBio, San Diego, CA	IgM 和 IgG 分开	定性酶标法，包被有纯化的糖脂肺炎支原体抗原的 96 孔微量滴定板	96	每条 8 孔	IgG, 2.35 h IgM, 2.75 h	15~20

注：[a]本表未包括所有在美国销售的肺炎支原体血清抗体诊断试剂盒。表中描述了几种代表性的检测方法，仅限于在独立研究中评估过的产品

期血清，限制了它在快速床旁诊断方面的应用。Meridian 生物科技公司开发的基于膜的 IgM 特异性 EIA 方法的免疫金卡(Immuno Card)，可用于单份血清样本快速检测急性肺炎支原体感染。但在一项研究中发现，用这种酶标法分析肺炎患儿的阳性血清时，单份血清敏感性只有 31.8%，双份血清敏感性可达 88%[140]。Thermo Fisher 公司开发的 Remel 酶标法是另一种快速床旁定性血清学试验方法，可以同时检测 IgM 和 IgG，不需要仪器，结果易读，敏感性、特异性与酶标法、免疫荧光法和补体结合法一样好。

有一些研究比较了现有酶标法试剂盒[137-139,141-146]，表 64-3 列举了对每种 EIA 试剂盒的评估。荷兰科学家将 PCR 作为参考方法综合评估了 12 种商业化酶标法和 PAs，他们发现大多数检测方法都存在敏感性或特异性方面的问题，提示它们在急性感染诊断中存在局限性，同时也重申了成人双份血清 IgM 和 IgG 抗体检测的必要性。通过评估表明 PCR 是一种更好的诊断方法[144]。另一项对欧洲使用的 10 个血清学试剂盒的评估发现，敏感性和特异性存在相当大的差异[147]。另有一项研究[148]在很多健康献血者血清中检出肺炎支原体抗体，提示某些商业化酶标法试剂的抗原存在交叉反应，可能导致过度诊断肺炎支原体感染。针对不同患者，最好的商业化酶标法试剂的选择取决于患者年龄、采血时间、双份血清获取的难易程度、仪器设备及实验人员的经验。但是，一个实验室同时开展多种检测方法并不经济实用。最适宜的诊断方法可能是 IgM 或 IgA 血清学试验并结合 PCR 方法，但可能对 IgM 达不到峰值的成人患者意义不大，而且显著增加实验室检测的成本。与肺炎支原体感染有关的冷凝素(O 型 Rh 阴性红细胞在 4 ℃发生的凝集检测)，仅出现在约 50% 的患者中。滴度达 64 或 128，或滴度呈 4 倍以上增长，提示近期有肺炎支原体感染，但该试验无特异性。因此不推荐用冷凝素的检测结果诊断肺炎支原体感染。

(二)生殖支原体感染

已有文献报道用微量免疫荧光、代谢抑制和

EIA等血清学方法检测人型支原体和脲原体[149-151]。研究表明，一种检测生殖支原体的微量免疫荧光法也已建立[152]，它可检测男性非淋病性尿道炎[153]和女性阴道炎[154]患者的抗体应答。与其他方法相比，此法具有快速、可重复，敏感性和特异性好，与肺炎支原体交叉反应较少等优点。现已开发出一种敏感性高、特异性好的以生殖支原体脂膜蛋白为抗原的血清学试验方法，这种技术与免疫印迹法联合，用于评估生殖支原体培养阳性的女性患者的免疫反应性[155]。目前在美国还没有标准化和商业化的生殖支原体感染的血清学诊断方法。因此，不推荐这些方法用于常规诊断。

十一、抗菌药物敏感性

(一)方法

几种常见的细菌抗菌药物敏感试验检测的方法已用于支原体检测。琼脂稀释法被用作为参考方法[156]，其优点是：终点相对稳定，不随时间改变；受接种量影响不大，并能容易地识别混合培养物。但此法对在诊断实验室分离到的少量菌株或偶见菌株不实用。纸片扩散法不能用于检测支原体抗菌药物敏感性，因为其抑菌圈直径和MIC值无相关性，此外，某些菌株生长相对缓慢也限制了此法的使用。尽管琼脂梯度扩散法（Etest，bioMérieux）测定MIC值的步骤还未标准化，但研究表明用此法检测四环素和氟喹诺酮类对人型支原体和脲原体敏感性的效果可与肉汤稀释法和琼脂稀释法相媲美[157-159]。Dienes染色有助于肉眼观察琼脂平皿上的椭圆形抑菌圈。E试验具有以下优点：以琼脂为基础的试验方法操作简单、终点不随时间改变、不受接种量影响，且可方便地用于单株菌的检测。此法适用于偶尔需要进行药敏试验的非专门从事柔膜细菌诊断的实验室。E试验条已商品化，可冷冻3～5年，使用商品化的SP4肉汤和琼脂检测效果良好。微量肉汤稀释法是最实用和最广泛使用的确定MIC值的方法。此法成本低，可在同一微量滴定板上检测多种抗菌药物，缺点是抗菌药物稀释的工作量大且终点易随时间的推移发生变化[116]。

CLSI已有达成共识的检测人类支原体和脲原体的标准化方法，它规定了微量肉汤稀释法和琼脂稀释法质控标准菌株MIC值的范围、培养基的组成及所选抗菌药物的MIC折点[160]。现已有MIC测定和质量控制的标准化方法，在做MIC测试时应当遵循操作规程。在微量肉汤稀释法中，将病原体和抗菌药物的混合物转种至新鲜培养基中稀释为亚抑菌浓度，可直接检测未变色孔中抗菌药物的杀菌活性，通过观察颜色变化判断病原体是否生长。已有文献对此法进行了更详细的描述[116]。

微量肉汤稀释法药敏试剂盒，如MycoplasmaIST2（bioMérieux），SIR Mycoplasma（Bio-Rad，Hercules，CA），Mycofast，Evolution2，Evolution3与Revolution（ELItech，Puteaux，France），以及Myco-Kit-ATB（Eurobio，Cedex B，France）和Mycoplasma System Plus（Liofilchem，Roseto degli Abeuzzi，Italy）等，在欧洲有售，但在美国不用于临床诊断。有些试剂盒可同时进行检测和鉴定。试剂盒是含有多种冻干抗菌药物的微孔板，一般有与阈值相关的一种或两种浓度，用此阈值判断常见细菌是敏感、中介还是耐药。迄今为止，只有Revolution试剂盒适用于抗菌药物敏感试验，且药物的浓度符合新版CLSI发布的支原体药敏试验指南，其中包括敏感药物和耐药药物的名称。

对于苛养的肺炎支原体[161-163]和生殖支原体[164-168]，已经开发出一种分子分析方法，可以检测23S rRNA的突变，这种突变可以直接从临床标本中获得大环内酯类耐药，而不需要在培养中分离。其中一种检测方法是，Resistance Plus MG（SpeeDx-Pty. Ltd.，Sydney，Australia），是一种商业化的多重PCR，用于检测生殖支原体和来自男性和女性尿和拭子样本的23S rRNA基因中的5个突变，这些突变使其对大环内酯类耐药。在对Resistance Plus MG的前瞻性评估中，与实验室开发的检测生殖支原体和溶出曲线分析或Sanger测序以确定23S rRNA突变的检测方法相比[169-170]，检测生殖支原体和检测大环内酯耐药突变的敏感性和特异性非常好。该产品在欧洲、澳大利亚和新西兰进行商业销售，但在美国尚未通过FDA认证。

(二)抗菌谱与治疗

一些抗菌药物的MIC值见表62-4。柔膜纲对所有β-内酰胺类、磺胺类、甲氧苄啶和利福平天然耐药。柔膜纲对大环内酯类和林可酰胺类的耐

药性因种而异，人型支原体对红霉素和其他十四、十五元大环内酯类耐药，对克林霉素敏感；脲原体属则与之相反。新型大环内酯类及酮内酯类抗菌药物对肺炎支原体和生殖支原体的体外敏感性和红霉素相当或更优。

一般认为肺炎支原体对喹诺酮类、四环素类及大环内酯类敏感，所以不推荐对以上抗菌药物进行药物敏感试验，除非体外评价新型及之前未检测过的药物。然而，日本、中国、欧洲和美国的研究表明，自 2000 年以来，急性呼吸道感染儿童和成人已在全世界范围内传播。23S rRNA 基因的Ⅴ区突变不断增加，使肺炎支原体对大环内酯类呈现高水平耐药[171]，目前肺炎支原体对大环内酯类的耐药率在欧洲一些国家高达 26%，在美国为 15%，在以色列为 30%，在亚洲为 90%～100%[6]。高水平耐药具有重要的临床意义，有时迫使临床医生选择喹诺酮类或四环素等进行替代治疗[6,161,172]。正在研究的 pleuromutilin lefamulin 在体外对具有高水平大环内酯耐药的肺炎支原体菌株表现出良好的活性，并可能最终成为治疗耐大环内酯类肺炎支原体的另一种选择[173]。如前一节所述，分子方法可通过 PCR 直接检测临床标本中 23S rRNA 突变，使监测耐药性趋势成为可能，而不必在培养中分离肺炎支原体，并可提供快速诊断信息，尽管目前还没有商业化的检测方法。

在 20 世纪 80 年代中期，已有文献报道了对四环素耐药的人型支原体和脲原体属菌株，耐药机制是由编码一种与核糖体结合的蛋白质的 *tetM* 基因介导，保护支原体免受这些抗菌药物的作用。人型支原体和脲原体属对四环素的耐药性，因地理分布和不同人群抗菌药物应用史不同而异，但在美国一些地区，支原体对四环素耐药率可达 40%～50%[11]。近期的研究发现了一些核糖体突变介导的高水平大环内酯类耐药的脲原体属[174-175]。然而，这种耐药现象在美国并不常见。

生殖支原体阳性的非淋球菌性尿道炎（NGU）或宫颈炎患者对阿奇霉素的敏感性比对四环素高，可能是因为大环内酯类的 MIC 值较低。但是，已有文献报道了具有临床意义的 23SrRNA 突变介导的大环内酯类耐药的生殖支原体[176-177]。来自欧洲、澳大利亚和日本的数据表明，目前在 30%～100% 的生殖支原体感染病例中检测到 23S rRNA 中的大环内酯类耐药突变[30,169,177-178]。在美国的一项多中心临床研究中，生殖支原体对大环内酯耐药率为 48%[92]。阿拉巴马州最近的一项研究发现，已知 23S rRNA 突变在 27 例男性的泌尿生殖或直肠样本中产生了大环内酯耐药性，其中 20 例（74.1%）大部分为无症状的 HIV 阳性男性，生殖支原体 PCR 阳性[168]。随着欧洲大环内酯耐药性的广泛传播，2016 年《欧洲生殖支原体感染指南》[178] 建议使用一种能够检测大环内酯类耐药突变的分析方法对所有阳性检测进行随访。目前主要有基于实时荧光定量 PCR 或焦磷酸测序的分子方法，包括上述章节中描述的新的商业分析方法[92,164-167,169]。在美国，这样的检测仍然未普及，因为 FDA 没有批准用于检测生殖支原体的试验，也没有获得此类检测的具体建议。

表 64-4 肺炎支原体、人型支原体、生殖支原体、发酵支原体和脲原体属对不同抗菌药物的 MIC 范围[a]

抗生素	MIC 范围（μg/ml）				
	肺炎支原体	人型支原体	生殖支原体	发酵支原体	脲原体属
四环素	0.06～0.25	0.2～2[b]	≤0.01～0.05	0.1～1	0.05～2[b]
多西环素	0.02～0.5	0.1～2[b]	≤0.01～0.3	0.05～0.1	0.02～1[b]
米诺环素	0.06～0.5	0.03～1[b]	≤0.01～0.2	ND	0.06～1[b]
替吉环素	0.06～0.25	0.125～0.5[c]	ND	ND	1～16[c]
红霉素	≤0.004～0.06[d]	32～>1000	≤0.01[d]	0.5～64	0.02～4[d]
克拉霉素	≤0.004～0.125[d]	16～>256	≤0.01[d]	1～64	≤0.004～2[d]
阿奇霉素	≤0.004～0.01[d]	4～64	≤0.01[d]	≤0.003～0.05	0.5～4[d]

（续 表）

抗生素	MIC范围(μg/ml)				
	肺炎支原体	人型支原体	生殖支原体	发酵支原体	脲原体属
替利霉素	≤0.008～0.06[d]	2～32	≤0.015[d]	0.06～0.25	≤0.015～0.25[d]
索利霉素	<0.000 000 063～0.5[e]	0.002～0.008	<0.000 032	<0.008	0.002～0.063
克林霉素	≤0.008～2	≤0.008～2	0.2～1	0.01～0.25	0.2～64
氯霉素	2	2～25	ND	0.5～10	0.4～8.0
庆大霉素	4	2～16	ND	0.25～>500	0.1～13.0
环丙沙星	0.5～2	0.1～4	2	0.02～>64	0.1～16.0
左氧氟沙星	0.5～1	0.1～2[f]	0.5～1	0.05～1	0.2～2[f]
莫西沙星	0.06～0.125	0.06～0.125[f]	0.03～0.06	≤0.015～0.06	0.125～1[f]
加雷沙星	≤0.008～0.125	≤0.008～0.063[f]	0.06～0.125	≤0.008～0.015	0.016～1[f]
吉米沙星	0.05～0.125	0.0025～0.01[f]	0.05～0.125	0.001～0.01	0.03～0.5[f]
利福平	>8	>1000	ND	25～>50	>1000
奎奴普丁-达福普汀	0.008～0.06	0.03～8	0.05	0.1～0.5	0.03～0.5
普那霉素	0.02～0.05	0.1～0.5	<0.01～0.02	ND	0.1～1.0
利奈唑胺	≥64	2～8	ND	ND	>64
Lefamulin	≤0.001～0.008[e]	ND	≤0.001～0.063[e]	ND	ND

注：[a] 此数据来源于采用不同方法和不同抗菌药物浓度测试的多个已发表的研究报告；ND. 尚无数据。[b] 仅指四环素敏感株；*tetM* 阳性的耐药菌株，四环素 MIC 值为 2 μg/ml 到>64 μg/ml。[c] 包括四环素耐药株。[d] 仅指大环内酯敏感的分离株含 rRNA 位点突变的耐药株的大环内酯 MIC 值为≥16 μg/ml。[e] 包括大环内酯耐药株。[f] 仅指氟喹诺酮类敏感株；喹诺酮耐药已含有突变的耐药分离株的左氧氟沙星的 MIC 值为 4～32μg/ml

左氧氟沙星、莫西沙星等喹诺酮类抗菌药物通常对所有人源性支原体和脲原体具有较好的活性。然而，在耐喹诺酮类抗菌药物的人型支原体、脲原体属菌株中已发现了 DNA 旋转酶和(或)拓扑异构酶Ⅳ基因位点突变[179-181]。莫西沙星是欧洲推荐的治疗不复杂的大环内酯类耐药或持续性生殖支原体感染的药物[178]。CDC 最新的(2015)指南还指出，对于持续性尿道炎、宫颈炎或 PID 伴有持续性检出生殖支原体的患者，可使用莫西沙星治疗[182]。然而，已有报道莫西沙星治疗失败，并与 *parC* 基因突变有关[183-184]。目前，欧洲对莫西沙星的耐药性检测并不常规，其耐药率低于 10%[185-186]，但在亚太地区对莫西沙星的耐药更为常见[183-184]。来自上述阿拉巴马州研究的最新数据[168]也表明，已知的 *parC* 突变与氟喹诺酮耐药有关，27 例(29.6%)男性中有 8 人的生殖支原体 PCR 阳性。从 25 例(24%)男性抽取的样本中，有 6 例同时存在对大环内酯类和氟喹诺酮类多药耐药。

柔膜纲的某些种对链霉素、氨基糖苷类和氯霉素等抗菌药物在体外显示有抑制作用，但这些药物极少用于柔膜纲感染的治疗。链球菌素原霉素和氨基环霉素已在有限的病例中成功地用于治疗耐抗菌药物的生殖支原体引起的感染[177]。唑烷酮类(如利奈唑胺)在体外对支原体无作用。

生殖器多发性感染通常在免疫功能低下的宿主中由耐多药的支原体和脲原体引起，因此，体外药敏试验在指导临床治疗中很重要。在这种情况下，即使细菌对所用抗菌药物敏感，根除感染也是极其困难的，仍需要延长治疗时间。这表明体内可达到有效浓度的大多数抗菌药物，对柔膜纲具有抑制作用，并无杀菌作用。而免疫功能在根除支原体感染中发挥重要作用。有关支原体和脲原体感染的治疗已有相关报道[187]。

十二、结果的评价、解释和报告

微生物实验室应着重针对已知能引起人类疾病的菌种建立检测方法，最好用培养技术进行确认。不常见或未建立培养方法的支原体，可通过少数专门的研究实验室或参考实验室提供的 PCR 技术进行检测。只有向临床医生和参考实验室的专业人员咨询后，才能开展此类病原体检测。除

脲原体属可通过脲酶试验和明显的菌落形态鉴定到种外，其余的支原体宜初步报告为“大菌落的支原体属”。

(一)肺炎支原体

在培养物中检测肺炎支原体(*M. pneumoniae*)，既耗时又不太敏感。但是分离自呼吸道标本的肺炎支原体在大多数情况下是有临床意义的，因为存在无症状携带者，其结果的解释应结合呼吸系统临床表现。上呼吸道可能存在正常菌群，疑似支原体感染的呼吸道或无菌部位标本需通过培养鉴定到种。通过参考实验室，采用 PCR 方法或其他分子诊断技术检测肺炎支原体越来越普遍，但是阳性结果仍需结合临床情况综合考虑。急性期与恢复期抗体效价呈 4 倍增长对急性感染具有诊断意义。儿童、青少年和中青年采用适当的免疫球蛋白种特异性试剂盒单次检测 IgM 阳性时，有时可诊断为急性感染，但并非总是如此，因为有可能存在 IgM 长期升高的情况。大多数情况下，经验治疗对肺炎支原体引起的轻微呼吸道感染有效，无需开展昂贵且耗时的微生物学检测。然而，具有临床意义的大环内酯类耐药的出现可能会影响经验性抗菌药物的选择。

(二)人型支原体

人型支原体(*M. hominis*)可在几天内培养获得。使用常规细菌培养基偶尔能在合适的临床标本中检出，但是不能依赖这种检测方法。从无菌体液或组织中分离出任何数量的人型支原体，都具有重要的临床意义，且必须鉴定到种。细菌定量分析也可能具有一定价值。

(三)脲原体

通过培养可在 24～48 h 内检出脲原体(*Ureaplasmas*)，当琼脂培养基中存在特征性形态的菌落及产脲酶的产生足以将其鉴定到属的水平。分离自正常无菌体液或组织的任何数量的脲原体都具有重要的临床意义，脲原体可引起新生儿或免疫抑制患者的严重感染。男性尿道脲原体数量<10^4和检测到女性下生殖道尿原体，很可能没有临床意义。在某些情况下，通过 PCR 技术最终区分脲原体属的解脲脲原体(*U. urealyticum*)和微小脲原体(*U. parvum*)，对分析它们的致病性差异具有重要意义，但目前并不推荐用于常规诊断。

(四)生殖支原体

越来越多的证据表明生殖支原体(*M. genitalium*)是泌尿生殖道的病原体，促使开发用于检测该病原体的诊断方法不断兴起，但迄今为止，美国仍无商品化的用于直接检测的分子生物学方法或血清学试验试剂盒。尽管曾有文献报道用于生殖支原体的培养技术[4,28,155,188]，但自 20 世纪 80 年代初期，生殖支原体被首次报道以来，实际获得的临床菌株极少。生长缓慢(在营养丰富的 SP4 培养基上生长需要 6 周或更久)和敏感性低导致培养方法不实用。生殖支原体的潜在重要性在于，它可通过性传播引起泌尿生殖道感染，所以其检测方法的改进和标准化尤为重要。目前，在美国的参考实验室中尚无商品化和标准化的 PCR 方法。从患有尿道炎、宫颈炎或盆腔炎患者的泌尿生殖道(如男性尿道或女性宫颈)的临床样本检出生殖支原体是有临床意义的。

参考文献请扫二维码查阅

第65章 衣原体属

JULIUS SCHACHTER，MAX CHERNESKY

（王红梅 译；刘文恩、穆红 审校）

一、分类

衣原体（*Chlamydia*）是一类无动力、专性细胞内寄生的原核细胞型微生物，它有独特的双相发育周期，存在形态、功能截然不同的2种形式，因此与其他微生物区分开来。近几十年，从多种宿主中分离出具有相似发育周期、专性细胞内寄生的微生物。这些宿主包括爬行动物、鱼类、昆虫，以及液体标本中的阿米巴原虫（这也是"环境衣原体"一词的由来）。这些属衣原体目的生物，虽形态上有细微差异，但都具有双相发育周期的特征（值得注意的是，有些尚未培养出来，但已通过DNA相关性分析被鉴定确认）。根据16S rRNA基因的DNA测序，衣原体目分为9个科[1]，除衣原体科，其中8个科通常被称为衣原体样生物（*Chlamydia*-like organisms，CLOs）[1-2]。有研究显示有些CLOs可引起人类致病[3-4]，虽然还没有足够证据表明CLOs应当进行常规临床实验室检测，但也有不少研究显示实验室检测是必要的。衣原体科只有唯一一个属——衣原体属，而将肺炎衣原体、鹦鹉热衣原体和畜群衣原体归为衣原体科的另一个属——嗜衣原体属的分类方法一直被衣原体研究协会抵制，因此，这一术语已被弃用[5]。本章仅关注衣原体属中重要的人类病原体。

其中，实验室中最常检测的是沙眼衣原体。沙眼衣原体有15个主要的血清型（和相应的基因型），用字母A～L表示。血清型A、B_a、B和C是沙眼的病原体。血清型D～K是通过性传播，引起眼部和生殖道感染，血清型L1、L2和L3是性病性淋巴肉芽肿的病原体（LGV）。

基于其生物学特性，L血清型也被称为LGV生物变种，而血清型A～K被称为沙眼生物变种。LGV生物变种在细胞培养中易于生长，而A～K的血清型在进行细胞培养时则需要机械辅助（离心）才能更好地吸附于细胞上。并且对于实验动物LGV生物变种也表现出更强的感染性。临床上LGV生物变种同样显示出比沙眼生物变种对人类有更强的感染性。LGV主要感染黏膜，主要引起男性的腹股沟淋巴结炎[6]。然而当今，LGV则更常认为是男男同性恋者（men who have sex with men，MSM）直肠感染的原因。目前还未发现沙眼衣原体的动物宿主。

肺炎衣原体（*Chlamydia pneumoniae*）可通过呼吸道进行人与人之间传播。是在进行沙眼衣原体感染研究中被首次分离出来[7]。其原生小体（elementary bodies，EBs）的抗原性和形态不同于其他衣原体。肺炎衣原体是一种呼吸道病原体，曾出现于社区获得性肺炎暴发中，也出现在社区和人员居住密集环境中（如大学、军队和疗养院）[8-9]。在某些动物中也发现有肺炎衣原体感染。

衣原体属内的其他衣原体也可引起人类致病，但这些疾病是人畜共患疾病，通常被视为单一感染，也可能因接触共同感染源或因职业接触造成群集感染，从而可能出现多个病例。人类通常是其终端宿主。这些衣原体自然存在于鸟类和哺乳动物中，其中，鹦鹉热衣原体被认为是人类感染中最常见的。这些衣原体多是引起其自然宿主的肠道感染。宿主的粪便导致的环境污染和气溶胶，是其他动物或人类的潜在感染源。因南美洲出口宠物鸟——鹦鹉到世界各地，其粪便产生的气溶胶，引起了1929－1930年人类鹦鹉热大流行[10]。虽然有鹦鹉热衣原体人传人报道，但仍是

罕见的[11-12]。通常，感染为单一病例，也可因接触共同感染源或职业暴露造成群集感染。例如，1948—1988年，美国各地火鸡加工厂的数百名工人感染鹦鹉热[13-14]。由于在火鸡中仍然发现有鹦鹉热衣原体感染，所以未来暴发鹦鹉热的可能性仍然存在[15]。在最近来自欧洲的一项meta分析中，鹦鹉热的病例有所增多，有1%社区获得性肺炎病例中报道为鹦鹉热衣原体[16]。

衣原体的分类也在不断发展中。最初分离的衣原体名称，通常反映分离的宿主物种，然而引起了一些混淆。后来，分类法得以简化，衣原体科(*Chlamydiaceae*)仅含一个属，分为两个种，根据包涵体糖原累积的能力和对磺胺嘧啶的敏感性不同，分为沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)和鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*)两个种(沙眼衣原体均为阳性，鹦鹉热衣原体均为阴性)[17]。现在，随着基因和DNA序列分析技术的发展，又发现了更多的新物种，再次使用最初的宿主物种名称的方式命名，例如，猫衣原体、鹦鹉热衣原体、沙眼衣原体、肺炎衣原体、鼠衣原体、鸟衣原体、流产衣原体、畜群衣原体、豚鼠衣原体、鸡衣原体、猪衣原体等[5]。过去有5种衣原体归为鹦鹉热衣原体，最近两种从鸟类分离到的鸟衣原体和鸡衣原体，也归为鹦鹉热衣原体。这些新发现的衣原体对人类疾病的意义还不十分清楚。随着研究的不断进展，更多新发现的物种，将通过DNA相关性分析进行分类。本章将重点讨论引起人类感染的沙眼衣原体、肺炎衣原体和鹦鹉热衣原体。

二、衣原体的特点(属的描述)

衣原体科的成员都具有独特的双相发育周期。衣原体的原生小体(elementary body, EB)是一个紧密包裹的含有RNA和DNA的颗粒，代谢不活泼。可感染真核宿主细胞，在宿主细胞外仅能短时间存活。当EB附着在易感宿主细胞上，可诱导吞噬作用，并抑制吞噬溶酶体的融合，持续存在于吞噬泡内[18]。经过约8h原生小体可分化为代谢活跃的网状体(reticulate body, RB)，并在胞质内通过二分裂方式繁殖[19]。然后经过24～48 h活跃的代谢和复制，网状体又重新生成许多子代EB，成百上千的EB从宿主细胞释放出来再感染其他的宿主细胞[20]。EB直径大约为300 nm，光学显微镜下可以看到。RB的体积大约是EB的2倍。RBs和EBs在吞噬泡内不断增多最终形成包涵体(inclusion)。包涵体染色后可在光学显微镜下观察。由于观察到沙眼患者标本中的包涵体而首次确定了衣原体与人类疾病的关系。包涵体内的衣原体颗粒与宿主细胞之间存在复杂的相互作用，它们之间的信息传导系统已经被证实，如包涵体特异性的蛋白质和分泌系统[21]。衣原体细胞壁含有属特异性脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)，在一些血清学诊断试验中用作抗原，如属特异性补体结合抗原试验。LPS没有维护衣原体结构稳定的作用。而是主要外膜蛋白和次要外膜蛋白之间的二硫键起着维护衣原体结构稳定的作用。并且EB与RB之间的转化(反之亦然)也依赖于二硫键的氧化还原[22-23]。EB约>40%的外膜成分为主要外膜蛋白(major outer membrane protein, MOMP)[24]，其大小约为43 kDa，并含有若干抗原特异性的可变位点[25]。是重要的外膜结构成分，该蛋白质由*ompA*基因编码。主要的不同血清型衣原体的基因序列均已明确，相对较小，为1.0 M～1.2 Mbp(900 ～ 1050个基因)，这些不同血清型的表型虽然不同，然而基因序列却有着极高的同源性。虽然沙眼衣原体生物变种与LGV生物变种在生物学上有着显著的差异，然而它们的DNA序列却几乎相同。

衣原体是专性细胞内寄生，这意味着它们依赖于宿主的代谢产物，而营养缺乏可以抑制其复制和形态转化[26]。宿主对感染的反应也会导致同样的结果。γ-干扰素在宿主对衣原体的保护性免疫应答中起重要作用[27]，可引起色氨酸消耗，从而干扰复制，诱导形成异常的RBs，并可能导致隐性或持续性感染[28]。使用抗代谢药物或抗菌药物在细胞培养中也可以观察到同样的反应[29-30]。虽然这些形态异常的衣原体很有可能会引起持续的感染，并可能在发病机制中起到重要作用，然而这一点尚未得到证实。

三、临床意义与流行病学

(一)沙眼衣原体

沙眼衣原体是引起沙眼的病原体，是世界上可预防的失明的主要病因。世界卫生组织估计，有超过100多万人因此致盲，在沙眼流行的地区

数千万人有致盲的危险[31]。在该病的高发区，儿童可在出生后一年内受到感染。沙眼的急性临床表现主要为滤泡性角膜、结膜炎，晚期表现包括结膜瘢痕伴倒睫、眼睑内翻、角膜损伤甚至失明。过去，许多沙眼流行地区，年龄组为 60 岁左右的人群中有 20%～30%因沙眼致盲[10]。沙眼多发生在贫穷和恶劣的环境中。许多国家随着经济和卫生条件的改善，沙眼的流行自然消失。世界卫生组织的一项全球倡议旨在 2020 年消除致盲性沙眼。这项倡议称为 FACE 策略：F 即面部清洁，A 即抗菌药物治疗（如使用阿奇霉素进行社区范围治疗以减少衣原体感染），C 即眼睑矫正手术（纠正眼睑变形、倒睫手术），E 即环境改善（主要是增设公厕灭蝇）[31]。苍蝇可能是沙眼衣原体传播的媒介。

沙眼衣原体也是世界上常见的性传播疾病的病原体。据世界卫生组织估计，2012 年，从血清型 D 到血清型 K 的沙眼衣原体导致 1.3 亿新的感染病例[32]。2015 年，美国疾病控制与预防中心（CDC）报道了 150 多万感染病例[33]。沙眼衣原体是男性非淋菌性尿道炎的主要病因，可引起严重的并发症附睾炎。女性因沙眼衣原体感染引起的疾病则更受关注，尤其是盆腔炎（pelvic inflammatory disease，PID）及其并发症[34-35]。大多数女性，沙眼衣原体感染无症状，但也是引起黏液脓性子宫颈炎、子宫内膜炎的常见原因。可经子宫颈、子宫内膜到输卵管上行感染。继而，可发展为盆腔炎，通常可出现严重急性输卵管炎的临床症状，也有许多上生殖道感染是无症状的，但无论是急性或隐性感染造成输卵管损伤都可能导致输卵管因素不孕和异位妊娠[36]。沙眼衣原体感染的孕妇可能在分娩时通过感染的产道将病原体传播给新生儿，继而可导致新生儿的结膜炎和（或）肺炎[37]。年轻人是感染沙眼衣原体的主要人群，患病率随着年龄的增长而下降。

许多国家已经实施了旨在减少衣原体感染和预防生殖道上行感染的控制计划。这些计划通常建议每年对 16～25 岁的性活跃女性进行筛查。在许多实施这些控制计划的地方，衣原体感染的患病率保持稳定甚或增加，但显然，后期的并发症已经减少[38-39]。这些控制计划未能降低感染患病率的原因尚不清楚。据推测，自然发生的感染可导致机体免疫的产生，而针对于筛查阳性的患者所进行的治疗缩短了感染的过程，导致出现了更多的易感宿主，从而使高危人群中出现更多的再次感染所致[40]。

沙眼衣原体血清型 L1～L3 可导致 LGV，是一种系统性性传播疾病（sexually transmitted disease，STD）。其典型的临床表现是阶段性的发病过程。机体早期损伤常在皮肤或外阴部位形成易被忽略的瘢痕，可发展为溃疡。第二阶段，几周内可发展为局部的淋巴结病。对于男性可发展为腹股沟淋巴结病，进一步可导致窦道和瘘管的形成。由于引流阴道的淋巴结是腹膜后的，腹股沟淋巴结病在女性中很少见。然而，女性仍可能出现严重的并发症，如肛门直肠瘘管和生殖器象皮病。因其主要流行于非洲、东南亚、南美洲和加勒比地区，LGV 又被称为热带腹股沟淋巴结病。然而当今，LGV 则更常见于肛交男性的直肠感染[41]。L2b 血清型在欧洲引起了一次 LGV 暴发流行。21 世纪初首次在荷兰的 MSM 中发现[42]，当时认为 L2b 血清型是一个新的变种。然而，对存档分离株的检测显示，L2b 变种曾是 20 世纪 80 年代旧金山 MSM 中引起直肠炎的主要病因，比在荷兰早出现 20 年[43]。

（二）肺炎衣原体

肺炎衣原体是一种常见的呼吸道病原体[44]。它可引起上呼吸道和下呼吸道疾病，是社区获得性肺炎的病原体之一。感染可从儿童时期开始，在成人人群中血清学试验阳性率极高（50%～70%）[45]。目前还没有临床研究发现肺炎衣原体引起的疾病与其他呼吸道病原体引起的疾病有区别。肺炎衣原体可在军队、监狱和学校等人员居住密集环境中引起流行[46]。肺炎衣原体被认为会引起冠状动脉疾病，大量证据支持这一假设[47]。然而，使用对肺炎衣原体有效的抗菌药物来预防继发性冠状动脉疾病的试验未获得预期结果[48]。并且，这些研究没有得到衣原体感染可引发冠状动脉疾病相关的结果[49]。所以，目前还不清楚肺炎衣原体是否与人类心脏疾病有关。肺炎衣原体在一些动物（马、考拉和蛇）中自然存在。

（三）鹦鹉热衣原体

鹦鹉热衣原体被认为导致了 1929－1930 年的人类鹦鹉热的大流行，当时被感染的鹦鹉及其他鹦鹉家族成员被当作宠物鸟从南美洲向世界各

地出口，造成了全球性传播[7]。鹦鹉热衣原体引起人类感染，可以无症状，但也可以引起严重感染，甚或致死性的肺炎及系统性感染。在前抗菌药物时代，人类鹦鹉热的致死率超过20%，60岁以上患者死亡率为50%[10]。鹦鹉及许多其他鸟类是鹦鹉热衣原体的自然宿主，此后逐渐发现多种哺乳动物也可作为其宿主。由于在很长一段时间里，衣原体种类的鉴定是基于实验室检测的一些生物学特性，因此，关于鹦鹉热衣原体的文献资料是混乱的。鹦鹉热衣原体具有典型的发育周期、共同的属特异性抗原、不能被碘染色的包涵体(用于检测沙眼衣原体包涵体中的糖原)和磺胺抗性。鹦鹉热衣原体最初分离于鸟类，后来鹦鹉热衣原体也包含了大量逐渐从哺乳动物中分离出来的衣原体，因为这些衣原体具有以上相同实验室检测的生物学特性。随着DNA同源性分类方法的发展，其命名发生了改变，从猫分离到的衣原体称为猫衣原体，从豚鼠分离到的衣原体称为豚鼠衣原体，从流产的羊分离到的衣原体称为流产衣原体等。

鹦鹉热衣原体在特定环境中也是一个重要的病原体。例如，饲养宠物鸟或在家禽加工厂(特别是美国的火鸡加工厂和欧洲的鸭子加工厂)工作的工人可面临感染的风险。通过选择性育种和广泛使用四环素浸过的种子，鹦鹉和其他宠物鸟的鹦鹉热衣原体的感染已经减少。由于鹦鹉热衣原体在野生鸟类中也广泛存在，因此集中贩运捕猎的鸟类可导致感染的大流行及之后的散发感染。鹦鹉热衣原体在笼子里、农场及加工厂等环境中都很稳定，主要通过粪便传播。因此，虽然无症状感染在持续接触者中常见，但仍有不少因接触共同感染源引起感染暴发的实例[50]。

来自鸟类的鹦鹉热衣原体对人类的致病能力似乎有相当大差异。职业暴露者的血清学调查常常可提供无症状感染的证据。来自火鸡的衣原体似乎分为低毒性和高毒性两类。而来自鹦鹉、长尾鹦鹉及其他品种鹦鹉的衣原体似乎能引起严重的人类感染。目前越来越多种类的衣原体被发现，但我们还不清楚其致病特性是否是种内或种间的共有属性。

来自哺乳动物的衣原体中，主要讨论流产衣原体。因流产衣原体可引起人类的严重感染。流产衣原体是山羊和绵羊流产的一个重要病因，并且已证明会导致人类流产，在农业地区被认为是一种职业危害[51]。相比之下，据报道，其他哺乳动物衣原体引起的人类感染通常相对温和，如猫衣原体引起的结膜炎[52]。

四、标本的采集、运输和保存

(一)总评

非培养的商品化诊断试验不需要标本中存在活的衣原体，但是需按照生产商提供的产品说明书中的指导正确地采集、转运和保存标本。这包括使用生产商指定的采集拭子和转运工具。采集的标本在常温，或冷藏条件下送至实验室。检测衣原体抗原或核酸的试验不需要保持冷链运输。

有些情况下可进行细胞学检查。例如，患包涵体结膜炎的婴儿，其特征性的细胞内包涵体很容易被发现。用刮刀收集的结膜刮屑优于用拭子收集的结膜刮屑。载玻片可用Giemsa或直接荧光抗体(direct fluorescent-antibody，DFA)染色(MicroTrak；Trinity Biotech Plc，Wicklow，Ireland)。类似的方法也可用于从禽类感染源检测鹦鹉热衣原体。检测鸟类中鹦鹉热衣原体最常用方法，从肝脏或脾脏表面的血清渗出液涂片或直接的器官印迹涂片，然后进行Macchiavello's染色(或改良Gimenez)或DFA染色[53]。

(二)沙眼衣原体

对于沙眼衣原体感染，标本采集的部位及检测试验的方法决定了采集标本的类型。应用核酸扩增试验(nucleic acid amplification tests，NAATs)进行下生殖道感染的诊断时，目前认为首选是无创采集的标本[54]，如男性的前段尿(first-catch urine，FCU)，女性的阴道拭子(vaginal swabs，VS)。这2种标本相对男性的尿道拭子及女性的子宫颈拭子更容易采集。同时女性更喜欢自己采集VS标本[55]。进行NAATs检测，VS的敏感性接近于子宫颈拭子，比尿标本更敏感，而对于男性，FCU的敏感性与尿道拭子一样[54-56]。有新的证据表明，尿道拭子是准确和可接受的[57]。使用这些无创标本的能力对筛选程序的实施非常重要。NAATs也可检测液基细胞学检测培养基中的子宫颈标本[58]。NAATs的检测结果可能与液基细胞学检测结果有重叠。然而，筛查非典型子宫颈病变人群的年龄通常高于筛查

性传播疾病的人群。

如果进行沙眼衣原体的分离，需采集男性的尿道拭子和女性的子宫颈拭子，以获得足够的被感染细胞。这一原则也适用于大多数的非培养诊断试验(NAATs 除外)。如果检测结膜感染，沙眼患者或患有包涵体结膜炎的婴儿及成人的拭子可用于衣原体培养和大多数的非培养诊断试验，而刮刀收集的刮屑更适合于细胞学检测。检测口咽感染，应该从后口咽部采集拭子；检测肛肠感染，则将拭子插入肛门 2.0～2.5 cm，并旋转几次采集。

(三)肺炎衣原体

肺炎衣原体感染的最佳标本采集部位并未明确规定，但已经使用鼻咽拭子、气管抽吸物、痰、活检标本和灌洗液。血液或心血管组织，不建议进行常规检测。

(四)鹦鹉热衣原体

检测组织标本时，需在严格的无菌条件下以及生物安全柜内进行。鹦鹉热衣原体是生物安全 3 级 (biosafety level 3，BSL3)的病原体，沙眼衣原体的 LGV 生物变种也是 BSL3，而其他衣原体是 BSL2。这个分类不反映当前使用的命名法，也不包括新发现的衣原体。在检测除沙眼衣原体和鼠衣原体以外的，特别是来自鹦鹉或火鸡的鹦鹉热衣原体标本时，必须谨慎，可能具有高度传染性。鹦鹉热衣原体多年来一直是实验室获得性感染的主要原因[59]。对禽类进行衣原体感染检查时，可采集肝脏、脾及其表面的血清渗出物。印迹涂片可用于细胞学检测，组织悬浮液可进行培养。

五、直接检查

(一)核酸扩增试验(NAAT)

NAATs 是沙眼衣原体感染最敏感的诊断试验。目前二代 NAATs 检测出的感染比早期的技术增加 30%～50%，并且具有更多优点(表 65-1)。并且在对无创采集的标本检测时，如 FCU 和 VS，表现出与诊断试验和筛选试验一样好的性能。通常，一天内可获得检测结果，而细胞培养则需要 3～7 天的时间得到检测结果。获得 FDA 批准的标本是男性的 FCU、尿道拭子和女性的 VS、子宫颈拭子、FCU。有些检测方法仅用 VS 和 FCU 标本(表 65-1)。并且这些标本的优越性得到了不同标本中目标载量检测值的支持[60]。

多数商品化 NAATs 是同时检测沙眼衣原体和淋病奈瑟菌的双重检测方法，因这两种病原体是性传播疾病中最常见的。这些试验可检测所有已知沙眼衣原体血清型，但是这些试验在检测 LGV 血清型的时候，不能将 LGV 血清型与 A～K 的血清型区分开来。这是这些试验一个明显的缺陷，因为目前对于强侵袭性的 LGV 生物变种感染的治疗方案是延长治疗时间[61]，并且需要对 LGV 感染的高危人群(如男男同性恋者 MSM)进行诊断分类继而做进一步的相关检测。有研究提供了能够检测 LGV 株的 NAATs[62]。这些试验还没有通过 FDA 批准，但已用于沙眼衣原体阳性标本的检测，结果显示 LGV 生物变种在 MSM 人群中流行。迄今 FDA 尚未批准任何商品化试剂用于生殖道以外标本的检测，但由于 NAATs 对于检测口咽和肛门直肠沙眼衣原体感染的高敏感性及高特异性，已经开始进行试验性检测[63]。对于临床和公共卫生方面，检测生殖道外标本非常重要。例如，增加生殖道外标本的检测相较于仅检测泌尿生殖道标本发现的感染的 MSM 的数量翻倍[64-65]。支持诊所检测生殖道外标本的实验室可以对所使用的 NAATs 进行验证试验。

至撰写本篇时，美国已经有 5 家生产商的沙眼衣原体 NAATs 试剂盒通过了 FDA 的认证：Abbott (RealTime CT/NG; Abbott Molecular Inc.，Des Plaines，IL)，Becton-Dickinson (BD ProbeTec ET and CT/GC and MAX CT/NG; Becton Dickinson and Co.，Sparks，MD)，Cepheid (Xpert CT/NG; Cepheid，Sunnyvale，CA)，Hologic (Aptima Combo 2; Hologic Inc，San Diego，CA)，and Roche (cobas 4800 CT/NG; Roche Molecular Diagnostics，Pleasanton，CA) (表 65-1)。

所有这些 NAATs 都具适用于筛查目的的有一定程度的自动化，可以进行高通量检测，并可在检测当天提供检测结果。表 65-1 比较了 5 种 NAAT 平台的功能特性[66-68]。虽然分析敏感性可能存在一些差异，但均表现出相似的临床敏感性[66,69-75]。目前，这些 NAATs 是诊断沙眼衣原体感染的最佳试验。不需要像曾经推荐的那样，对 NAATs 阳性结果进行确证试验，因为两者并无差别[54,76]。

表 65-1 五种第二代商品化核酸扩增法检测人类[a,b]标本沙眼衣原体和淋球菌的功能特征

试验特征	RealTime m 2000 CT/NG	Probe Tec ET CT/ GC Q[x]	XpertCT/NG	AptimaCombo 2 CT/GC	cobas CT/ NG 4800
方法	RT-PCR	SDA	PCR	TMA	PCR
公司	Abbot Molecular	Becton-Dickinson	Cepheid	Hologic	Roche
仪器	M2000	Viper XTR	GeneXper Infinity	Panther	cobas 4800
模式	Semiautomated batching with 96-well plates	Automated batching with 96-well plates	Automated random access with cartridges	Automated random access with tubes	Semiautomated batching with 96-well plates
实际时间(min)					
1 个标本	40	65	1	20	24
96 个标本	64	100	35	28	40
维护时间(h)[c]	10	14	0.5	2.5	2.7
到最终结果的时间(h)					
1 个标本	3.9	2	1.5	3.6	2.9
96 个标本	6	3.5	3.2	5.2	4.4
FDA 批准的生殖道标本[d]	CCVS,SCVS	SCVS, CS	SCVS, CS	CCVS,SCVS	CCVS,SCVS
女性	CS(symp only),FCU	TP, SP, FCU	FCU	CS、TP,FCU	CS, TP
男性	US(symp only),FCU	US,FCU	FCU	US,FCU	FCU

注:[a] 摘自参考文献[66]和[68]。[b]RT-PCR. 逆转录-PCR;real-time PCR. 实时 PCR;SDA. 链置换扩增;TMA. 转录介导的扩增;SCVS. 自行采集的阴道拭子;CCVS. 临床采集的阴道拭子;SP. Surepath medium;TP. ThinPrep medium; US. 尿道拭子;FCU. 前段尿;symp. 有症状。[c] 每月 20 天,每天 96 份测试。[d] 未经批准用于口咽拭子或直肠拭子测定

在瑞典曾经发生了一次罕见的实验事件,出现的一种新的沙眼衣原体变种,在隐蔽性质粒中有 377bp 的缺失[77]。一些商用 NAATs 核酸扩增的靶序列正在这段缺失的区域内。使得这种新沙眼衣原体变种的感染在使用这些商用 NAATs 的实验室被漏检。这实质上造成了这个感染的流行病学上的漏检。幸运的是,这个新变种不具有特殊的生物学优势,因此,没有造成大量的感染流行[78]。生产商们很快针对这一新的变种,使用缺失区域外的序列作为靶序列改进扩增引物,来检测这一瑞典的新变种。也正是因为这个教训,生产商现在更倾向于设计使用两个靶序列来进行核酸扩增检测,以避免仅依赖于一个可能变异或缺失的靶序列而出现漏检。

目前,NAATs 的主要缺点是价格昂贵。因此,在低发病率人群中进行检测时,应用合并策略(或池化策略 pooling strategies)以降低成本[79]。通过这一策略,在发病率只有 1%~3%的人群中,试剂成本可减少高达 50%。

由于缺少可与之比较的金标准,对衣原体感染的诊断试验的评估存在一些问题。尽管进行商品化试验的评估已超过 30 年,但是这甚至也是诊断沙眼衣原体感染的一个问题。由于这些 NAATs 获得了 FDA 的批准,人们希望能够使用包装说明书提供的敏感性和特异性数据或已发表论文中的数据,根据最佳性能、价格和检测通量来选择检测方法。然而,来自被引用的临床试验中的敏感性和特异性数据才是有效,而在不同的研究中这些数据没有直接的可比性。由于缺乏金标准,FDA 创建了评估这些试验的参考标准。近年来,FDA 使用"患者感染状态"作为参考标准。即——如果一个患者的任何标本使用 2 种不同试验方法的检测结果均呈阳性,则认为该患者已感染,而来自该患者的所有标本均应呈阳性,以此来评估这些诊断试验的优劣。然而,情况并非总是如此。因为,对于女性,可能出现尿道感染,但没有宫颈感染,反之亦然[80]。如果按照"患者感染状态"的参考标准,一位女性的一个部位标本经确认是阳性,另一解剖部位标本的阴性结果应该被认为是假阴性。然而实际上,来自该女性没有感染

的另一解剖部位标本的阴性结果，实际上是真阴性。这种系统性偏差影响了计算敏感性和特异性数据的准确性。

用二代 NAATs 方法处理临床标本时，通过目标捕获系统来进行核酸提取，几乎完全消除了标本中抑制剂的影响。从而使得 NAATs 的性能显著提高[81-82]。目前第二代 NAATs 检测生殖道标本中沙眼衣原体核酸的敏感性远高于 90%，特异性>99%(注意以上为相对数据)。

大约 20 年前，核酸杂交试验是诊断沙眼衣原体的流行方法，但现在已被更敏感的 NAATs 所取代。

目前检测肺炎衣原体的方法，已经 FDA 认证的有 2 种商品化分析方法，分别是 BioFire respiratory panel (bioMérieux) 和 Curetis Unyvero assay (Curetis)。但是，这 2 种方法在用于肺炎衣原体感染的诊断上都没有被充分评估。许多研究实验室已经开发出 NAATs，但尚不清楚哪种是最优的。在进行比较试验时，有相当大的差异[83]。

诊断鹦鹉热衣原体，目前还没有商品化的 NAATs。因此，有兴趣应用 NAATs 诊断鹦鹉热衣原体感染的实验室必须使用已发表的研究方案或开发自己的试验。并且发现的衣原体种类日益增多，NAAT 在衣原体感染的诊断上可以发挥重要的作用。有两种直接的方法可用于 NAAT 的开发：先用一个共同的衣原体靶序列进行扩增，然后使用更特异的靶序列和多重核酸扩增对阳性结果再次进行检测[84]。

(二)抗原检测试验

1. 直接荧光抗体试验(DFA)　20 世纪 80 年代，随着 Syva 公司抗沙眼衣原体主要外膜蛋白(major outer membrane protein，MOMP)的种特异性异硫氰酸荧光素标记的单克隆抗体的问世，标志着现代分子诊断方法的商品化[85]。DFA 可用于鉴定细胞培养分离衣原体的包涵体。而传统的吉姆萨染色法是观察结膜、生殖道涂片等临床标本中的衣原体的 EBs，而不是包涵体。然而，由于 DFA 的背景中会出现小的碎片及一些小的细菌产生的非特异性荧光，这就要求显微镜操作者需要经过良好的训练以排除这些非特异性的干扰。DFA 的敏感性低于细胞培养，更低于 NAATs；因此，不推荐常规使用 DFA[86]。然而，在有些情况下，如婴儿或成人包涵体性结膜炎，由于其操作过程仅需约 30 min，可用于快速诊断。DFA 试剂目前仍在上市(MicroTrak；Trinity Biotech Plc，Wicklow，Ireland)，但是最初的试验 FDA 仅批准用于生殖道涂片标本的检测。抗衣原体脂多糖(lipopolysaccharide，LPS)的荧光素标记单克隆抗体也已上市(MeriFluor Chlamydia Direct Fluorescent；Meridian Bioscience，Cincinnati，OH)，虽然 EBs 染色强度较弱，但由于其他种的衣原体也可被染色，因此可用于检测沙眼衣原体以外其他种衣原体的感染。

2. 酶免疫试验(enzyme immunoassay，EIA)　酶免疫试验通过单克隆或多克隆抗体检测衣原体 LPS 进行沙眼衣原体的检测。由于 LPS 游离于感染细胞或分泌物中的 EBs 之外，因此比结合在 EB 细胞壁中的物质成分更容易检测到。该试验为属特异性，但由于其他一些细菌与衣原体 LPS 共享表位，因此可能存在潜在的交叉反应和非特异性假阳性结果。如果初始试验为阳性，可以使用阻断抗体抑制阳性结果，以提高试验的特异性[87]。EIAs 的敏感性远低于目前使用的 NAATs，故不推荐常规使用。

3. 细胞学检测　吉姆萨染色检测包涵体的细胞学方法可用于诊断新生儿急性包涵体结膜炎，但是对于成人结膜感染和生殖道感染不敏感。该方法也可检测人感染的鹦鹉热衣原体。检测鸟类感染，常用方法是从肝脏或脾脏表面血清渗出液涂片或直接的器官印迹涂片，然后进行 Macchiavello's 染色，EBs 在绿色背景下显示为红色，但包涵体少见。本书第 20 章讨论了这种染色方法。

4. 床旁检测(POCT)　床旁检测(point-of-care tests，POCTs)或称快速检测，适用于医疗场所，可在 30 min 内提供沙眼衣原体感染的检测结果。不仅在医疗场所提供便捷，还可快速筛查无症状女性是否感染衣原体。对于男性，通常只检测有症状者，目前还没有对异性恋男性进行常规筛查的建议。美国疾病预防和控制中心建议每年对 16～25 岁之间性活跃的女性进行沙眼衣原体常规筛查。一部分检测阳性的女性几周后才到诊所接受治疗，还有一些女性不去接受治疗[88-89]。这些女性有将感染传染给伴侣或发展成盆腔炎的危险。而 POCTs 快速检测的阳性结果更易使这些女性得到及时的治疗，以减少上述问题的发生。

现有许多商品化的 POCTs。但目前所有的 POCTs 性能都有缺陷，不推荐使用[90-91]。较早的 POCTs 主要是抗原检测。新一代的 POCTs 很可能是 NAATs。

六、分离

(一)生物安全注意事项

临床实验室存在实际的和潜在的获得性感染风险。前抗菌药物时代，在研究鹦鹉热病因时，实验室获得性感染常有发生，并且常是严重的，甚至是致命性的[59]。由于实验室现在普遍使用生物安全柜，实验室感染的发生显著减少。目前，鹦鹉热衣原体和沙眼衣原体的 LGV 生物变种被认为是生物安全 3 级(BSL-3)生物，其他衣原体为生物安全二级(BSL-2)生物。由于命名法的改变，原来的鹦鹉热衣原体现在有五个不同的种，并且还不断有新的种被发现。其中的许多种会导致人类疾病。因此，需要在生物安全柜中谨慎处理具有潜在传染性的标本。任何从患病的鹦鹉或火鸡进行分离衣原体时都应当格外谨慎。

沙眼衣原体对实验室工作人员不构成危险。然而，LGV 生物变种感染并不只局限于黏膜，如：结膜的感染。小鼠经鼻内接种 LGV 株可导致眼部感染(类似于 Parinaud's oculoglandular syndrome，帕里诺眼淋巴结综合征)。也可引起实验室工作人员呼吸系统疾病和淋巴结炎。

(二)标本处理

用于分离衣原体的标本采集后应尽快冷藏，并保持冷链(4～8℃)直到接种于组织培养基。在某些情况下，需要对野外采集的标本冷冻保存，但是需要注意避免反复冻融，否则会影响衣原体的分离效果。通常，衣原体培养应使用含有抗生素的运输培养基，以减少或防止细菌和真菌污染，因为多数情况下标本中也同时存在其他微生物。培养基应是添加 10%胎牛血清、L-谷氨酰胺、葡萄糖、庆大霉素(10μg/ml)、万古霉素(50 μg/ml)和制霉菌素 (10 U/ml)的组织培养基。

(三)眼部和生殖道标本

从生殖道或眼部标本中分离沙眼衣原体，应从感染部位采集拭子标本，方法是在结膜上滚动擦拭拭子，以及清除表面分泌物后将拭子插入男性尿道或女性宫颈管内 2～3cm 处进行采集。采集后的拭子应直接放入含抗菌药物的运输培养基中。标本采集后，应尽快送至实验室，并保持冷链。如果标本反复冻融，将会影响衣原体的分离效果。用于 NAATs 检测的标本，如 FCU(男性前段尿)和 VS(女性阴道标本)，不适合进行培养。

(四)腹股沟淋巴结炎脓液、血液、痰、咽漱液及其他呼吸道分泌物、组织标本和粪便标本

腹股沟淋巴结炎脓液、血液、痰、咽漱液及其他呼吸道分泌物、组织标本和粪便标本都有一些共性。如：通常对细胞培养系统有毒性，常有细菌污染等，所以处理这类标本的方法基本上是相同的。标本需采集或均接种于含抗菌药物的组织培养运输培养基中。应在生物安全柜中，可使用玻璃珠进行涡旋或使用研钵研磨进行均质处理。然后将标本稀释(至 10%～20%)，低速离心(300×g 10 min)，除去沉淀，并进一步稀释以降低毒性。用细胞培养基制备系列稀释液，接种于易感细胞。组织标本、腹股沟淋巴结炎脓液和粪便标本，则通常需要连续稀释(1:10 到 1:1000)以消除毒性的影响。

(五)细胞培养

细胞培养一直被认为是诊断沙眼衣原体感染最敏感的检测方法。但是 NAATs 更灵敏，易操作，可更有效检测无创采集的标本。随着 NAAT 检测方法的出现，培养法的敏感性比预想的明显偏低，这可能是由于 NAATs 可检测出在标本运送或操作过程中死亡的衣原体。NAATs 正日益取代细胞培养法。首次从沙眼和生殖器感染病例中分离衣原体，采用鸡胚卵黄囊接种。小鼠也被用来分离 LGV 生物变种和鹦鹉热衣原体。以往常用鸡胚卵黄囊培养衣原体，现仍使用卵黄囊接种用于抗原制备，但不用于常规分离。目前细胞培养法检测衣原体是唯一用于法医学应用的推荐方法，如儿童性侵案件[92]。这是由于对非培养法检测衣原体的特异性错误的认识造成的，但很显然，NAATs 和基因分型技术更敏感，并提供了更多关于型特异性的信息。实验室在检测标本时，在可能涉及与法医学鉴定相关的标本时，应该注

意哪种检测方法的检测结果是法院认可的。

衣原体的细胞培养仅在一些专门的实验室中开展。通过细胞培养方法，检测衣原体对抗菌药物的敏感性。下面描述了细胞培养中通常使用的分离程序，可以根据特定的用途对其进行微调整。例如，对于沙眼衣原体而言，35℃孵育可能是最佳选择，而对于鹦鹉热衣原体而言，37℃孵育可能更为理想。可以根据不同的情况使用不同的细胞系。例如，HL 和 Hep2 细胞对于肺炎衣原体的生长可能会略好一些。最常用于沙眼衣原体分离的细胞是 McCoy 细胞（实际上是 L 细胞系），HeLa 细胞和 BGM 细胞。根据实验室处理标本的体积，选择培养的细胞在 1-dram 小瓶中的盖玻片上或直接在多孔板里生长。早期的融合的细胞单层应通过以下方法接种：移除维持性组织培养基，将其替换为临床标本的接种液，然后以约 2500×g 的速度离心 1 h。之后，移除临床标本的接种液，然后换以含有放线菌酮（1μg/ml）的组织培养基（培养基最低限度必须加入 10%胎牛血清，补充谷氨酰胺和葡萄糖）[93]。放线菌酮能够抑制哺乳动物细胞的代谢，而有利于衣原体的生长。之后，将细胞在 35℃于 5%CO_2 的环境中孵育 48～72h。然后将培养的细胞单层用甲醇固定，并用 DFA 试剂染色以检测衣原体包涵体的存在。从 1-dram 小瓶中取出盖玻片并通过直接显微镜进行衣原体包涵体的检测，而多孔板孔内染色的细胞单层则使用倒置显微镜进行检测。为了获得最大限度的敏感性，在第一次接种时应该同时使用阴性标本进行盲转传代。

维护一个敏感的分离系统，必须注意诸多细节。在有一名受过良好训练的临床医生来提供足够的上皮细胞标本或其他适当的标本的前提下，保持冷链和快速运送至实验室。并且同时需要保证一个敏感的、无污染的细胞系。所有阴性标本均需要进行盲转传代。所有试剂和培养基也需要进行常规的质量控制检查。例如，通过滴定以保证放线菌酮的最佳使用浓度。

(六)鉴定

对于鉴定沙眼衣原体来说，可以最有效地鉴定细胞培养中的衣原体的方法是，用种特异性荧光标记单克隆抗体对细胞单层进行染色。在鉴定其他衣原体时，脂多糖属特异性荧光标记的单克隆抗体的检测方法是首选。这些抗体试剂可以显示典型的衣原体包涵体并识别特定的抗原，从而确定阳性结果。以下抗体试剂有市售（MeriFluor Chlamydia Direct Fluorescent；Meridian Bioscience，Cincinnati，OH）。

七、分型系统

随着基因分型技术的迅速发展，全基因组测序可能将在不久后成为鉴定未知衣原体的一种实用方法。通常情况下，血清学分型和表型分析并不是必须的，但是对于流行病学研究及法医学的应用则是需要的；在辅助诊断 LGV 生物变种引起的 MSM 直肠感染上是有价值，因为 LGV 生物变种感染，需要延长治疗时间[61]，但这一概念尚未进行随机临床试验研究。血清分型用于流行病学研究，但试剂较难获得。较多基因分型的研究方法中，目前，最多用的是多位点序列分型（multilocus sequence typing，MLST）[94]。MLST 使用 7 个管家基因的 DNA 序列，通过评估野生分离株或临床标本中衣原体与这些序列的相关性进行分型。MLST 比血清学分型及 ompA 基因分型具有更高的分辨能力。管家基因序列可从衣原体 MLST 数据库（http://pubmlst.org/chlamydiales/）获得。MLST 及其他基因分型方法目前均未在临床实验室中常规使用。这些方法无须分离培养病原体，可直接对沙眼衣原体阳性标本进行基因分型。

八、血清学试验

血清学试验对于衣原体感染的诊断作用是有限的。可能有助于人类鹦鹉热、性病淋巴肉芽肿、呼吸道肺炎衣原体感染（特别是肺炎衣原体培养困难）[45]及由沙眼衣原体感染引起的新生儿肺炎的诊断。婴儿如果可检测到高水平沙眼衣原体 IgM 抗体，并且有明确的衣原体暴露史，血清学试验对沙眼衣原体引起的婴儿肺炎具有诊断意义[95]。婴儿在分娩时经过受感染的产道而暴露于衣原体。然而，婴儿可能检测到高水平的 IgG，可能反映母体的 IgG 水平，但 IgM 抗体可表现为缺失。

血清学试验在临床流行病学研究和旨在确定

沙眼衣原体临床感染谱的研究中更有价值。一些疾病是由感染引起的严重并发症，如：Fitz-Hugh-Curtis 综合征、男性附睾炎、输卵管性不孕和异位妊娠等，通过血清学试验发现，这些疾病都与沙眼衣原体感染有关。在这些患者体内可检测到高水平抗衣原体抗体。

应用血清学试验进行衣原体感染的诊断，其中存在的问题主要是在成年人群中的高水平的肺炎衣原体抗体，以及在性传播衣原体感染的高危人群中的高水平的沙眼衣原体抗体。另外，由于缺乏标准化的抗体制备而较难进行试验的评估。有研究建议，可通过血清学方法检测相关年龄段人群血清中沙眼衣原体抗体阳性率判断地区性沙眼衣原体感染停止的时间，来评估沙眼疾病预防控制措施的效果[96]。

(一)补体结合试验

种特异性补体结合试验(CF test)用于诊断人类鹦鹉热，并支持性病淋巴肉芽肿(lymphogranuloma venereum，LGV)的诊断。由于 CF 抗原还未上市，所以 CF 试验的应用受到限制。从受感染的卵黄囊悬浮液制备补体结合抗原相对容易，但仍不能很好地满足试验需要。

(二)微量免疫荧光试验

微量免疫荧光试验(MIF test)是由 Wang 和 Grayston 在 20 世纪 70 年代创建的一项技术[97]，目前仍为衣原体血清学诊断最常用的方法。该试验通过检测患者血清中衣原体种特异性抗体和血清型特异性抗体及反应性抗体的免疫球蛋白类型。若急性期和恢复期双份血清抗体滴度呈 4 倍以上增加，可用于支持衣原体感染的诊断。然而，由于在感染高危人群(性传播疾病的年轻患者，感染肺炎衣原体的成年人)中原有抗体水平普遍较高。以及对于无症状感染者，由于时间节点难以判断，而不易获得恢复期及抗体滴度 4 倍增加的血清标本。因而限制了该试验方法用于衣原体感染的诊断。检测的高水平 IgG 滴度如：≥32 或≥256，可有助于 LGV，人类鹦鹉热，男性附睾炎，异位妊娠，输卵管性不孕等的诊断。用于这些检测的试剂已上市(Chlamydia MIF IgG；Focus Diagnostics，Cypress，CA)。美国菌种保藏中心(American Type Culture，Collection Manassas，VA)提供了沙眼衣原体检测板。目前该方法的主要问题是缺乏标准化，以及如何正确判读试验结果。

(三)酶免疫分析法

针对沙眼衣原体合成肽、纯化的 EB 混悬液、LPS 和沙眼衣原体 EBs 提取的 LPS 的酶免疫分析法(EIA)中，Liaison Chlamydia trachomatis IgG and IgA(DiaSorin Ltd.，Dublin，Ireland)和 Captia Chlamydia IgG EIA(Trinity Biotech Plc，Wicklow，Ireland)的方法已上市。然而这些已上市的方法经研究，均未得到充分的评价可推荐为常规诊断使用[98-99]。

一些研究者使用纯化的衣原体蛋白或质粒编码蛋白作为抗原用于衣原体感染诊断和流行病学研究[100]。尽管一些研究结果是有发展前景的，特别是用 Pgp3 获得的研究结果。但仍因经验不充足，酶免疫分析法不推荐作为常规诊断方法，而更适合进行流行病学研究。

九、抗菌药物敏感性试验

目前美国疾病与预防控制中心推荐非复杂性沙眼衣原体感染的治疗方案是单次剂量 1 g 阿奇霉素及 100 mg 强力霉素，每天 2 次，连续 7 天。尽管临床有治疗失败的情况，但目前尚无令人信服的证据证明沙眼衣原体对常用抗菌药物(阿奇霉素或强力霉素)产生耐药。然而，应当高度警惕耐药性的出现。有推荐在 LGV、人类鹦鹉热的治疗上延长治疗时间，但是这一建议需要获得临床试验的支持。

抗菌药物敏感性试验并不复杂。一个标准的接种是每张盖玻片需要接种 100～300 感染形成单位(infection-forming units)，去感染敏感的上皮细胞。之后，移除接种液，再用含有经过倍比稀释的待检测抗菌药物的培养基替换，从而进行药物敏感性的检测。详细操作程序请参看本章“细胞培养的描述”部分。孵育 48 h 后，用 DFA 试剂对细胞单层进行染色检测包涵体。最低杀衣原体浓度定义：经传代培养后无包涵体形成，无子代活菌生长的抗菌药物的最低浓度。MIC 定义：包涵体数量减少 50% 的抗菌药物浓度。药物敏感性试验的检测结果应当与临床疗效相符。

衣原体感染治疗失败的情况确有发生，但目前建议继续治疗[61]。关于衣原体抗菌药物耐药的情况，目前还不认为是一个问题。这些年，有关于衣原体对四环素或大环内酯类药物耐药的散在报道，但尚未得到证实，并且其他研究者并未获得耐药的沙眼衣原体分离株。

体外诱导衣原体对利福平和氟喹诺酮类药物的耐药相对容易[101-102]。内酰胺类药物可能导致异常衣原体颗粒和包涵体的出现。内酰胺类药物去除后，衣原体则恢复其结构的完整性及复制能力。所谓的异型抗菌药物耐药其实是因高滴度接种液的人为因素造成，与表型抗菌药物耐药无关[103]。

十、结果的评价、解释及报告

试验结果报告应尽可能包括所使用的检测方法的类型及临床解读。多数的试验结果报告是来自 NAAT 的结果。应注意试剂盒说明书的解释部分及试验对标本的要求。不符合要求或未被批准的标本需要一定的验证试验，并且应该在结果报告中说明。结果报告应该明确报告沙眼衣原体核酸阳性（或阴性），而不需要讨论其感染状态。

如果使用未经 FDA 批准的试验，则应在结果报告中提供该试验方法的详细说明。

目前，由于其敏感性低，POCT 或抗原检测试验不推荐使用。除非可检测急性期和恢复期的双份血清，否则血清学试验呈阳性反映的只是在某一时期的感染，而不一定是正在做检测时期的感染。结果报告应该只报告抗体阳性。

参考文献请扫二维码查阅

第66章 立克次体属和东方体属

LUCAS S. BLANTON，DAVID H. WALKER，DONALD H. BOUYER

（苏丹虹 译；韩立忠、穆红 审校）

一、分类学

立克次体科包含2种小的，专性细胞内寄生的细菌属，即立克次体属（*Rickettsia*）和东方体属（*Orientia*），它们自由驻留于宿主细胞胞质内。虽然每一种菌属内的病原菌株数量和多样性相似，但种的习惯命名明显不同。《*Bergey* 系统细菌学手册》（*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*）第2版罗列了20种获得权威组织认可和批准的立克次体属菌名，以及一些提议种[1]。（作为）仅由两个种组成的属内成员之一的恙虫病东方体（*Orientia tsutsugamushi*）菌株间的 *rrs* 基因（16 S rRNA）存在0.8%的差异性。同样，其他专性细胞内寄居菌（如查菲埃里希体（*Ehrlichiachaffeensis*），贝纳特柯克斯体（*Coxiella burnetii*，*rrs*）和沙眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*），其种内菌株 *rrs* 基因也有0.5%的差异性。为了界定立克次体属内种间差异，一份基于既往命名所不能接受的标准而提议的标准承认不同物种亲缘关系可相近到0.2%的 *rrs* 差异、0.8%的柠檬酸合成酶（*gltA*）差异，1.2%的外膜蛋白A（OmpA）差异，0.8%的外膜蛋白B（OmpB）差异以及0.7%的胞浆抗原基因（*sca4*）差异[2-3]。没有像描述真核生物一样的常见或通用概念能被用来详细地描述原核物种。然而，在原核生物中，*rrs* 基因1%的差异被认为是同一物种间的自然分离。因此，相比于细菌的基因差异，立克次体属包含了特别多的已命名物种。

最初通过明确它们不同的脂多糖抗原利用系统发生树可将立克次体属（*Rickettsia*）划分为伤寒群（*the typhus group*，*TG*）、斑点热群（*the spotted fever* group，SFG），以及过渡群和广泛分布于节肢动物的其他类别[4]。TG只有2个成员，即普氏立克次体（*Rickettsia prowazekii*）和伤寒（*R. typhi*），而斑点热群包含有通常被鉴定为人类致病菌的细菌，如立氏立克次体（*R. rickettsii*）、康诺尔立克次体（*R. conorii*）、非洲立克次体（*R. africae*）、西伯利亚立克次体（*R. sibirica*）、日本立克次体（*R. japonica*）、霍氏立克次体（*R. honei*）、帕氏立克次体（*R. parkeri*）、马赛立克次体（*R. massiliae*）、摩纳哥立克次体（*R. monacensis*）、斯洛伐立克次体（*R. slovaca*）、艾氏立克次体（*R. aeschlimannii*）和瑞士立克次体（*R. helvetica*），以及其他只在节肢动物体内被发现的成员[1,4-5]。过渡群属于伤寒群和斑点热群之间的进化支，包含了病原体小蛛立克次体（*R. akari*），澳大利亚立克次体（*R. australis*）和猫立克次体（*R. felis*）[6]。大多数致病性未确定的立克次体菌种（*Rickettsia* spp），包括蒙大拿立克次体（*R. montanensis*）、贝氏立克次体（*R. bellii*）、皮氏立克次体（*R. peacockii*）和扁头蜱立克次体（*R. rhipicephali*），在美国扁虱中比具有致病性的立氏立克次体更加广泛得多。最初在以色列和俄罗斯阿斯特拉罕地区发现的斑点热群分离株，实际上具有更广泛的地域性分布，是康诺尔立克次体的遗传变异株。在亚洲南部，已有关于病原体尚未确定的斑点热群立克次体病的报道[7-8]。

恙虫病东方体，一度被认为是东方体属中唯一的菌种，与立克次体属相比，*rrs* 基因具有约10%的差异性，且细胞壁的结构差别很大，包含完全不相关的蛋白质和缺乏脂多糖（表66-1）。基于编码分子伴侣家族的一个成员的 *groEL* 基因的系统发生提示，东方体属遗传多样性与立克次体属斑点热群相似，因此，可能有太多的菌种已被命

名的情况(图 66-1)[9-10]。最初通过血清学分类的恙虫病东方体随后被进行基因分析[11]。各地均存在多个遗传变异株。种系进化树显示,有 9 个基因簇与血清型不一致。目前尚无强有力的证据证明,基因型地域而异[11]。恙虫病东方体的遗传变体(的种类)好像与特定的节肢动物宿主相符合,差异很有可能是在宿主体内发生的。东方体属近来仍在变化,增加了一个已获权威机构认可并批准的新菌种,即中东东方体新种(*Orientia chuto* sp. nov),该菌分离自迪拜一位感染患者[12]。其 *rrs* 与恙虫病东方体的 *Ikeda*、*Kato* 和 *Karp* 菌株同源性为 98.5%,与 47 000 蛋白基因一致性仅为 84.1%～84.6%[12-13]。也有遗传学证据显示,在智利存在东方体属的另一个成员,*rrs* 基因初步分析显示,它与恙虫病东方体具有 97%的序列相似性,与中东东方体新种也有类似程度的相似性。来自随后的患者焦痂中的 56 000 蛋白基因的扩增片段,说明它与恙虫病有 94%～97%的同源性,系统发生树分析将它分组为加藤部族成员[14]。对来自非洲和欧洲鼠脾的东方样 DNA(*rrs* 基因 94.4%～100%相似)进行分子生物学的检测分别集中在中东东方体新种和一个新的来源组[15]。

表 66-1　立克次体属和恙虫病东方体的特点[a]

菌种	LPS	OmpA	OmpB	17 000 脂蛋白	56 000 蛋白质
斑点热群 SFG	S	+	+	+	0
伤寒群 TG	T	0	+	+	0
加拿大立克次体 *R. canadensis*	T	+	+	+	0
贝氏立克次体 *R. bellii*	B	0	+	+	0
恙虫病东方体 *O. tsutsugamushi*	0	0	0	0	+

注:[a] LPS. 脂多糖;S,SFG. 脂多糖存在;T. TG 脂多糖存在;B. bellii-type 脂多糖存在;+. 存在;0. 缺失

二、属的描述

立克次体物种是体积小[(0.3～0.5) μm×(1～2) μm]的专性细胞内寄生的 α 变形菌纲(*Alphaproteobacteria*),具有革兰染色阴性菌细胞壁结构,其含有脂多糖、肽聚糖,一种重要的 135 000 S-层蛋白质(OmpB)和 17 000 脂蛋白,而对于立克次体斑点热群 SFG,则是包含一个携带数量不等的近乎完全相同串联重复单元的外膜蛋白 A(OmpA)[16]。立克次体含有因还原演化而致的小[(1.1～1.5) Mb],且富含 AT 的基因组,该基因组含有大部分非编码序列(19%～24%)。在立克次体的斑点热和伤寒群中,基因组有显著的同线性[17]。与糖代谢、脂质生物合成、核苷酸合成、氨基酸合成和代谢相关酶基因的缺乏及编码与整个三羧酸循环相关酶基因和几个 ATP / ADP 移位酶基因拷贝的存在(现象)表明为了(获取)营养和(完成)固相组装,立克次体利用宿主资源可独立合成 ATP 和从宿主获得 ATP。立克次体靠 OmpB 黏附于宿主 Ku70 细胞受体(对于斑点热群,也可通过 OmpA 黏附于一种 $\alpha_2\beta_1$ 整合素受体上,借助 Sca1 和 Sca2 黏附于未知受体上。)黏附激活信号通路,引起诱导性吞噬的募集和活化。立克次体可通过立克次体磷脂酶 D 和溶血素 C(TlyC)的膜溶解作用从吞噬体中逃脱[19-21]。恙虫病东方体[(0.3～0.5) μm×(0.8～1.5) μm]有一个 2.1 Mb 的基因组,包含很大比例的可移动遗传元件,重复基因、碎片基因和低编码能力的基因序列[22]。该菌有一种重要的 54 000～58 000 表面蛋白及 110 000、80 000、47 000、42 000、35 000、28 000 和 25 000 的表面蛋白和肽聚糖,但缺乏脂多糖。与立克次体菌种相比,东方体拥有更富弹性的革兰阴性细胞壁,其外边包膜的外层较厚,内层较薄。

三、流行病学和传播

在立克次体生命周期中,至少有一个阶段寄居于一种节肢动物宿主(蜱虫、螨虫、虱、跳蚤或其他昆虫)体内。在此期间,它们供养在经卵和(或)相关水平传播到脊椎动物宿主的循环

中[23-26](表 66-2)。恙虫病东方体物种在自然界可经卵传播而被供养在恙螨(*trombiculid mites*)体内，它们在幼虫期进食时将感染传递给人类(表 66-2)。

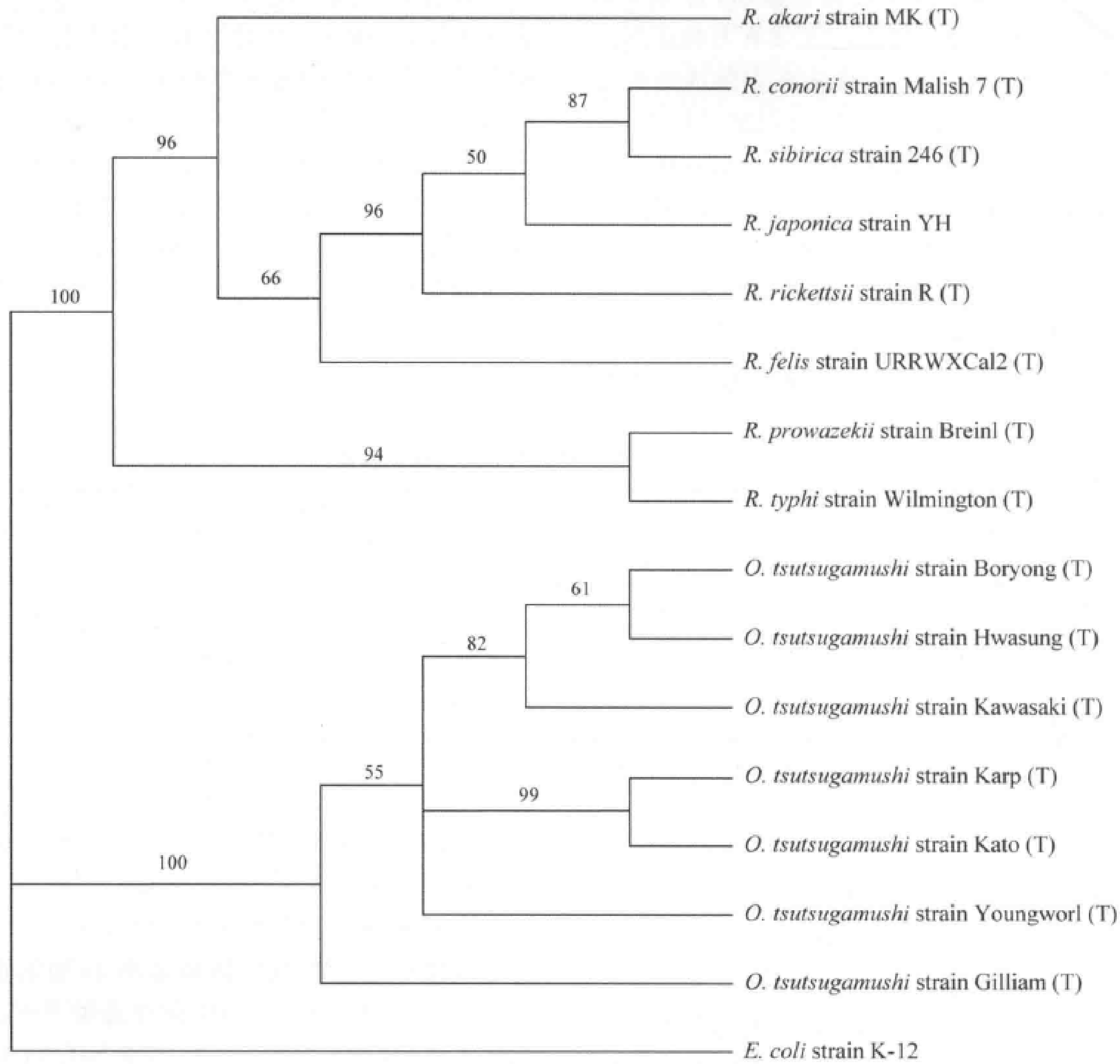


图 66-1 以大肠埃希菌(*Escherichia coli*)为外类群，用 *groEL* 基因序列的未加权最大简约分析确定立克次体和东方体的系统发育(由 PAUP 4.0 软件编写)。分支上的数值代表距离最近节点的基因差异度

表 66-2 立克次体病的病因学、流行病学和生态学

菌种	疾病	地域分布	人类传播方式	自然周期
SFG				
R. rickettsii	RMSF	西半球	蜱咬	蜱经卵传播，蜱-脊椎动物循环
R. conorii	马赛热(Boutonneuse fever)	欧洲南部，非洲，中东	蜱咬	蜱经卵传播，可能的蜱-脊椎动物循环
R. africae	非洲蜱咬热(African tick bite fever)	撒哈拉以南非洲，加勒比	蜱咬	蜱内经卵传播
R. parkeri	美国蜱咬热(American tick bite fever)	南美，北美	蜱咬	蜱内经传播

（续　表）

菌种	疾病	地域分布	人类传播方式	自然周期
R. sibirica	亚洲北部蜱传斑疹伤寒（North Asian tick typhus），立克次体相关淋巴管炎（lymphangitis associated rickettsiosis）	亚洲、非洲、欧洲	蜱咬	蜱内经传播
R. japonica	日本斑点热（Japanese spotted fever）	日本、韩国	蜱咬	蜱
R. heilongjiangensis	远东蜱传立克次体病（Far Eastern tick-borne rickettsiosis）	俄罗斯	蜱咬	蜱
R. honei	弗林德斯岛斑点热（Flinders Island spotted fever）	澳大利亚、亚洲	蜱咬	蜱内经卵传播
R. slovaca	蜱传淋巴结病（Tick-borne lymphadenopathy）	亚欧大陆	蜱咬	不明
TG				
R. prowazekii	原发性虱传斑疹伤寒（primary louse-borne typhus）	世界范围	破损皮肤或黏膜接触感染的虱粪或吸入气溶胶	人-虱循环，鼯鼠-蚤和（或）虱循环
R. typhi	复发性斑疹伤寒（Brill-Zinsser disease）	世界范围	虱传斑疹伤寒感染后复发	
	鼠型斑疹伤寒（murine typhus）	世界范围	破损皮肤或黏膜接触感染的虱粪或吸入气溶胶	鼠-蚤循环，负鼠-蚤循环
Transitional group				
R. akari	立克次体痘（rickettsial pox）	美国、乌克兰、克罗地亚、韩国、土耳其、墨西哥	螨咬	螨内经传播，螨-鼠循环
R. australis	昆士兰斑疹伤寒（Queensland tick typhus）	澳大利亚	蜱咬	蜱
R. felis	虱传斑点热（flea-borne spotted fever）	北美、南美、欧洲、非洲	不明	猫蚤经卵传播
Scrub typhus group				
O. tsutsugamushi	丛林斑疹伤寒（scrub typhus）	日本、东亚、澳大利亚北部、西太平洋和西南太平洋、印度洋	恙螨叮咬	螨内经卵传播

四、临床意义

除美国本土的落基山斑点热（Rocky Mountain spotted fever，RMSF）、立克次体痘（rickettsialpox）、鼠型斑疹伤寒（murine typhus）、鼯鼠相关性普氏立克次体感染、虱传斑点热（flea-borne spotted fever）、帕氏立克次体感染和“菲氏立克次体候选种（Candidatus *Rickettsia philippi*）”之外，非洲蜱咬热（African tick bite fever）、马赛热（boutonneuse fever）、鼠型斑疹伤寒（murine typhus）及丛林斑疹伤寒（scrub typhus）输入性感染的可能性很大（表 66-2）[27-33]。其他立克次体病或因为它们的地理分布，旅行者暴露/接触立克次体的罕见事件，或因为它们的偶然性，不像是输入性的。即使对原本健康的年轻人，落基山斑点热，虱传斑点热（louse-borne typhus），和恙虫病都是一类危及生命的疾病。鼠型斑疹伤寒和马赛热在老年或是有基础疾病或其他危险因素的患者中能产生致命后果。一项对 140 例感染有康诺尔立克次体的葡萄牙住院患者的研究显示，酗酒和 *Israeli* 菌株感染是与致命后果有关的危险因素。死

亡病例发生急性肾功能衰竭、高胆红素血症、反应迟钝、呼吸急促、瘀斑皮疹、胃肠道症状、凝血功能障碍的概率更高[34]。

在被带有立克次体的蜱虫叮咬后的平均7天内，落基山斑点热患者会出现发热，严重头痛、精神萎靡、肌痛，常伴恶心、呕吐和腹痛和阵发性咳嗽[29]。皮疹通常在发病仅3～5天后出现。立克次体感染内皮细胞，常导致血管通透性增加，局部出血。在重症病例中，非心源性肺水肿和伴昏迷和惊厥性脑炎是严重病情，通常预示死亡[35-36]。

帕氏立克次体引起一种，伴有蜱叮咬处焦痂，发热、头痛、肌痛，常有斑丘疹或丘疱疹，偶发局部轻度淋巴腺炎，无死亡病例报告的温和型疾病[37]。立克次体痘多被认为是一种伴有播散性水疱疹和借助螨虫叮咬在立克次体注入部位（形成）焦痂的城区性非致死性疾病[30]。与广泛存在的猫蚤相一致，立克次体感染被发现有着广泛的地理分布[38]。猫立克次体感染的全部临床表现尚未确定。尽管报道的一些病例表现出与其他立克次体相似的体征和症状[39]，但在撒哈拉以南非洲发热受试者和非发热对照者的血液中循环的猫雷杆菌DNA的意义尚待阐明[40-41]。

稍过半数鼠型斑疹伤寒患者出现皮疹，许多患者会出现咳嗽，胸部影像学出现浸润影，提示肺炎，重症患者出现惊厥、昏迷、肾衰竭和呼吸衰竭，约10%的住院病例需要收入重症监护室治疗[28]。

非洲旅行归来者出现发热、一个或多个焦痂，某些患者还出现局部淋巴结病、斑丘疹或疱疹，提示很可能感染非洲立克次体[31]。通过暴露/接触于低剂量传染性的细菌气溶胶染病，普氏立克次体、立氏立克次体、伤寒立克次体和康诺尔立克次体具有生物威胁性[42]。

恙虫病东方体导致恙虫病发生的地理区域是以北部的韩国、俄罗斯、南部的澳大利亚和印度尼西亚，西部的巴基斯坦和阿富汗、东方的日本、菲律宾和密克罗尼西亚为边界划分的[43]。临床症状和体征包括发热、头痛、斑丘疹、焦痂、间质性肺炎表现，暂时性聋，淋巴结病并累及中枢神经系统[7,43-44]。一项包含191例确证为恙虫病患者的研究，观察了恙虫东方体Boryong和Karp 2种基因型感染患者之间临床表现的差异，包括：虚弱（91%和61.1%）、焦痂（97%和73.7%）、皮疹（94%和68.4%），以及结膜充血（45.1%和3%），这些症状在Boryong基因型感染患者中，发生频率更高[45]。如果不治疗，病死率可达30%[46]。中东东方体感染先症病例临床表现为焦痂、淋巴结病、广泛性肌痛，继而发热、嗜睡、出现皮疹[12]。

五、标本的收集、运输和存储

在病程中，应尽早采集血液标本。分离立克次体(Rickettsiae)，需在开始使用有效的抗立克次体抗菌药物前用无菌肝素抗凝管采血[29,47]。利用免疫荧光检测内皮细胞可用来检测斑点热群立克次体病。对于利用抗体捕捉循环内皮细胞的分离和免疫细胞学诊断，血液标本可以暂时置4℃并需尽早处理。如果延迟接种细胞培养基或动物可能超过24 h，血浆、白细胞层、全血或活检组织需迅速冷冻并储存在－70℃或液氮中。急性期采用的EDTA或柠檬酸钠抗凝血，借助核酸扩增实验(NAAT)，可有效地用于诊断南欧斑疹热、鼠型斑疹伤寒、流行性斑疹伤寒、日本斑点热，以及丛林斑疹伤寒和敏感性稍低的落基山斑点热和非洲蜱咬热，[31,48-52]。当核酸扩增实验应用立克次体感染病灶的活检标本时，尤其是焦痂[34,53-55]其诊断率更高。当全血、血浆、白细胞层或组织在数天内不能进行NAAT检测时，应存放在－20℃或更低的温度环境。用于核酸扩增实验的血清敏感性较低，但常用于诊断致死性病例[56-57]。当拭子在4℃下储存达到72 h时，采集用于核酸扩增实验检测立克次体的焦痂拭子提供的DNA是足够的。采集包括使用无菌盐水浸棉拭子在去除顶部焦痂的上方大力旋转[58]。

尽可能在病程早期采集血液进行血清学诊断，1～2周后采集第二份样本。如果抗体效价未上升4倍，从开始（采样）的3或4周后采集第三份样本。血清在4℃可以保存数天，但对于更长时间，应该在－20℃或更低温度下可保存以避免抗体降解。在偏远地区，置于合适吸墨纸上并以普通邮件派送的手指血，可以用于血清学诊断[59-60]。采用免疫荧光分析(indirect immunofluorescence assay,IFA)诊断丛林斑疹伤寒时，这种方法采集的标本，即使在室温下运输，血清学诊断的敏感性也与新鲜血清相似[60]。

需尽快采集直径约3 mm孔径的皮肤病变活检标本，最好是含瘀点的斑丘疹，或焦痂边缘[61-62]。

虽然不应该延误治疗,但是最好在四环素或氯霉素治疗前 24 h 内进行活检。对于免疫组化法检测立克次体,标本可被速冻后用于冰冻切片,或在中性甲醛缓冲液中固定后用于制备石蜡包埋切片[30,36,61-65]。前一种方法可更快速地获得结果,但冰冻样本容易扭曲组织结构,固定组织更便于运输到参考实验室。无菌操作采集尸检组织,如脾和肺,可用于立克次体分离,组织最好趁新鲜接种,如果样品需要被运送到公共卫生机构或参考实验室,样本可于 4℃放置 24 h,或者在 −70°C 储存更长时间。尸检组织还可通过免疫组化或核酸扩增方法用于检测立克次体。

流行性斑疹伤寒疑似患者衣服中移除的体虱(*Pediculus humanus corporis*)可用于检测立克次体的存在。体虱获得立克次体后可保持终身感染,因而即使在不能保证体虱存活的温度和湿度条件下的长时间运输之后,仍可用作一种可用于核酸扩增诊断的样本[66]。

六、直接检测

治疗决策在疾病急性期很重要。据笔者所知,目前对于急性期明确诊断最重要的核酸扩增和免疫组化诊断方法仅限在包括笔者实验室在内的一些参考实验室内使用。可与以下实验室主管取得联系后咨询免疫组化病例个案:David H. Walker,得克萨斯大学医学院病理系,301 大学大道,Keiller 大楼,1.104 房间,Galveston TX 77555-0609[电话,(409)747-3990;传真,(409)772 1850;e-mail,dwalker@utmb.edu]。Sherif Zaki,疾病预防控制中心病理部,克利夫顿路 1600 号,G32,亚特兰大,GA 30333[电话,(404)639-3133;e-mail,sxz1@cdc.gov]{Sherif Zaki,Atlanta,GA 30333[telephone,(404)639-3133;e-mail,sxz1@cdc.gov]}。Robert Massung,立克次体人畜共患病分支,疾病预防控制中心,克利夫顿路 1600 号,Mail Stop G-13,亚特兰大,佐治亚州 30333[电话,(404)639-1082]。

(一)免疫检测

利用免疫组化技术检测皮疹和焦痂病变活检组织的甲醛固定,石蜡包埋切片中的立克次体可诊断落基山斑点热、帕氏立克次体感染、南欧洲斑疹热、非洲蜱虫热、鼠型斑疹伤寒、虱传斑疹伤寒及立克次体痘[35,55,62-63,65](图 66-2,左图)。斑点热群或伤寒群立克次体特异性脂多糖单克隆抗体免疫组化染色已被用于检测立克次体(图 66-2,右图)[63-64],但无商品化抗体。免疫组化法检测皮肤活检标本中立氏立克次体的敏感性和特异性分别为 70% 和 100%[29,62]。

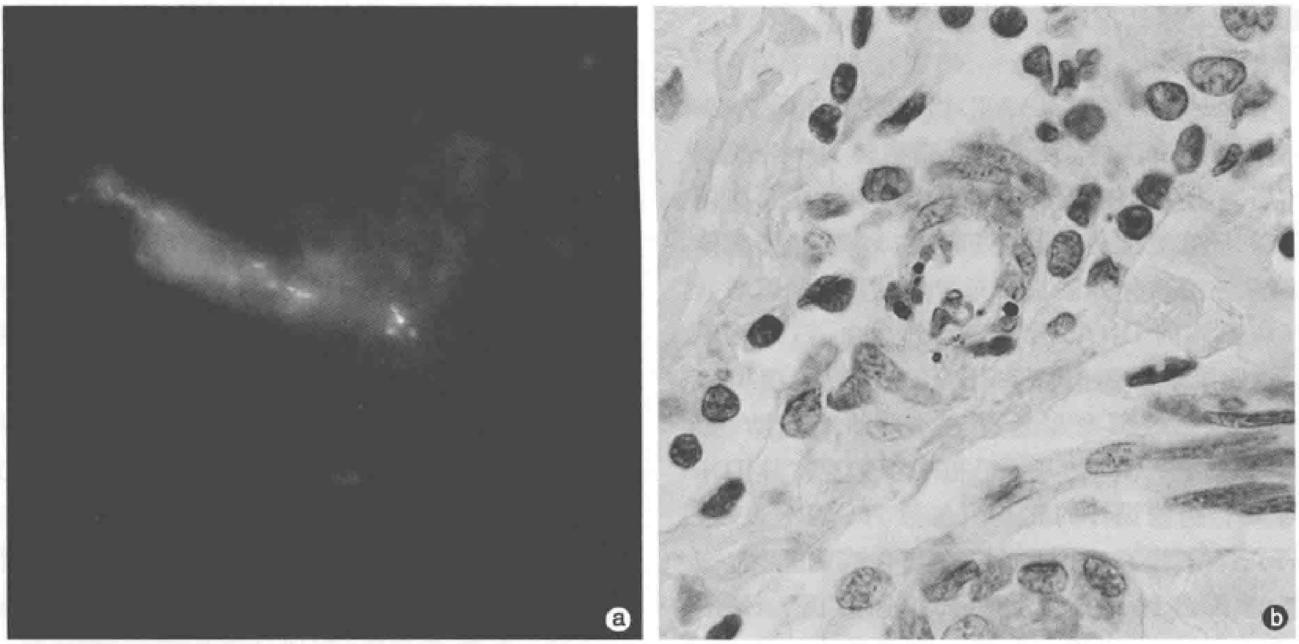


图 66-2 注:a. 使用抗 SFG 立克次体(*Rickettsia*)抗体对皮肤组织活检样本进行直接免疫荧光染色有助于快速诊断。*Rickettsiae* 存在于血管壁上。b. 1 例有 RMSF 病史患者的真皮微血管系统中立克次体的展示。可以在血管壁上发现立克次体。使用直接抗 SFG 脂多糖单克隆抗体进行免疫过氧化物酶染色。皮肤组织活检放大 800 倍,见彩插

对于斑点热群立克次体病的诊断，焦痂组织活检提供了灵敏的样本，这些样本显现出类似的病变并应该考虑用于立克次体疱疹、帕氏立克次体感染、南欧洲斑疹热或非洲蜱虫热疑似患者的诊断评价。由于免疫组织标本处理过程导致种特异性抗原可能发生热变性，因此，免疫组化法只能在斑点热群或伤寒群水平区分立克次体(*Rickettsia*)。

在免疫荧光染色检测细胞内的立克次体后，借助使用包被有抗人内皮细胞表面抗原单克隆抗体的磁珠从血液样本中捕获内皮细胞可完成循环内皮细胞中康诺尔立克次体的免疫细胞化学检测[47]。该方法敏感性为50%，特异性为94%。在56%未接受治疗和29%接受抗立克次体治疗的患者中检测到了立克次体。利用免疫组化方法在人内皮细胞、树突状细胞、巨噬细胞和心肌细胞中的可发现恙虫病东方体[67]。这种原位杂交技术虽已建立但尚无用于临床样品中立克次体检出的报道。皮肤活检标本也能用于灌木丛伤寒(scrub typhus)诊断[68]。用小鼠多克隆抗恙虫病东方体的Boryong抗体进行免疫组化染色检测斑丘疹皮肤样品的敏感性为65%，特异性为100%。相同抗体进行焦痂病变组织染色产生100%敏感性和特异性。抗菌药物治疗3～4天后，焦痂活检组织测试的患者显示诊断效率没有明显降低。

(二)分子检测

核酸扩增试验(NAAT)已被用于立氏立克次体、帕氏立克次体、康诺尔立克次体、日本立克次体、伤寒立克次体、普氏立克次体、非洲立克次体、西伯利亚立克次体、猫立克次体、小蛛立克次体、斯洛伐立克次体及恙虫病东方体的DNA扩增，这些(病原体的DNA)通常来自外周血、白细胞层、血浆，偶尔来自新鲜、冷冻或石蜡包埋的组织，来自焦痂溃疡底部及患者身上发现的节肢动物媒介[31,48-50,66]。不同的基因已被用于立克次体DNA的扩增。引物设计的靶基因包括16S rRNA基因(*rrs*)，保守管家基因(如柠檬酸合成酶基因，*gltA*)，像那些编码外膜蛋白的抗原基因(*sca0*和*sca5*)及17kDa脂蛋白基因。似乎没有一个特定的基因靶点比另一个(基因)更有优势。常规、巢式和实时定量PCR(qPCR)技术已经全部被使用，但每种方法都有其优缺点。如果需要测序以鉴定种特异性病原体，常规的PCR和巢式PCR的方法能够获得更长的扩增子片段。实时定量PCR是定量，样品高通量，污染降低的可能性，不同种或群特异的探针的多重性，以及获得更高的分析敏感性成为可能。实际上，据报道，qPCR在每个反应中已能检测不到10个拷贝的基因组DNA[69-70]。因为具有扩增低含量DNA模板的能力，核酸扩增试验具有在疾病的早期或急性期，抗体产生前检测到立克次体的能力。在诊断前用抗生素经验性治疗的患者中，其敏感性(28%)略高于立克次体分离培养(19%)[71]。尽管qPCR的分析敏感性令人印象深刻，但尚不清楚将其应用于临床标本时有多大的益处，测试收集的标本时，其检测敏感性仅略高于用巢式PCR(16%对18%)[69]。

在感染期，外周血样本中的循环性立克次体DNA的数量的有限妨碍了临床上分子检测技术的敏感性。使用全血样本，核酸扩增试验检测结果与血清学金标准作对比，核酸扩增试验对全属的敏感性的范围为6%～69%[72-75]。对源自这些文献中收集的数据进行仔细分析，报道其中等敏感性为18%[76]。当立克次体DNA在血液样本中被检测到时，它通常是存在于有严重或致命后果患者的身上[56-57]，当它在患有那些落基山斑点热患者体内被检测时，那些死亡患者体内立克次体DNA的数量更高。核酸扩增试验的临床应用在组织中更常见，在组织中其敏感性远大于外周血。应用于皮肤活检标本，尤其是对治疗前的焦痂(检测)的核酸扩增试验具有48%～92%的敏感性[72,75,78]。使用盐水浸泡的无菌棉签是一种有效且无创的方法用于收集焦痂中的立克次体DNA以用在核酸扩增试验中[58,79-81]。

在临床中，通常不需要种特异性诊断，但立克次体基因得到扩增后，需要鉴别特异性病因病原体时，种特异性诊断可通过限制性片段长度多态性分析或对核酸扩增产物序列测定进行。限制性片段长度多态性分析可使用*gltA*和17-kDa抗原基因扩增片段的AluⅠ内切酶酶切产物[82]，用*sca*5基因的RsaⅠ或AluⅠ内切酶酶切产物[83-84]，*sca*0基因的限制性内切酶组合(RsaⅠ，PstⅠ，AluⅠ，XbaⅠ和AvaⅡ)酶切的产物[85]。举个例子，引物组RP.330(2)Fw：5′-ATGGCTCAAAAACCAAATTTTCTAA-3′和Rp.330(2)Rv：5′-AGCTCTACCTGCCCATTATCTGTACC-3′，靶

定 *sca*5 基因扩增出 990～1000bp 的核酸扩增产物(长度由物种决定);当用基因 Alu Ⅰ 内切酶酶切时,(引物组)可区分 11 种不同的立克次体物种[84]。基于探针的 qPCR 通常有多种,提供了区分立克次体不同群间感染(斑疹伤寒与斑点病发热组)的可能,甚至通过设计靶向引物和探针从选定的病原体中鉴定出相同的种[75,86-87]。环介导等温扩增技术既实用又便宜,并且已被研究用来检测立克次体 DNA。尽管它们的分析敏感性似乎是成功的,每个反应的检测下限为 5～100 个 DNA 拷贝,但由于使用 PCR,它们的临床实用性有限[88-90]。因为它们有可能用于资源有限的地区,所以重组酶聚合酶扩增技术具有开发的吸引力[91],但与上述分子方法情况一样,循环体液中立克次体生物体的缺乏将可能限制它们用于检测外周血样本中的立克次体。

对于恙虫病东方体,56 kDa 蛋白基因是诊断性核酸扩增实验的常见靶标。巢式核酸扩增分析技术在疾病急性期的恙虫病东方体感染诊断中有用[49]。使用引物 p34(5′-TCAAGCTTATT-GCTAGTGCAATGTCTGC-3′)和 p55(5′-AGG-GATCCCTGCTGCTGTGCTTGCTGCG-3′)的核酸扩增实验扩增血样来源的 DNA 产生 1003bp 的产物,然后再通过巢式核酸扩增实验,使用引物 p10(5′-GATCAAGCTTCCTCAGCCTACTATA ATGCC-3′)和 p11(5′ CTAGGGATCCCGACA GATGCACTATTAGGC-3′)扩增出一个 483 bp 的产物。该测定法可检测 10 种恙虫病东方体的原型菌株,并且不扩增鼠伤寒沙门氏菌或本氏菌。利用东方体 *htrA* 基因的实时 PCR 实验已用于临床样品的诊断[92-94]。当 *groEL* 基因被用作靶基因分析 61 例刚入院泰国患者的血液样本时,观察到了最敏感的检测水平(每微升血沉棕黄层 DNA 含 2 个拷贝)。在这个分析中,引物组(正向引物 5′-TTGCAACRAATCGTGAAAAG-3′;反向引物 5′-TCTCCGTCTACATCATCAGCA-3′)扩增出 459bp 的基因片段。作为一种应用于斑疹伤寒急性期的诊断方法,这种定量 PCR 方法是一种推荐方法并且已证实比常规或巢式核酸扩增试验更灵敏[94]。

在没有使用 qPCR 机会的实验室,56 kDa 蛋白基因和 *groEL* 基因靶标都能用在诊断斑疹伤寒的巢式核酸扩增反应中[96]。*groEL* 基因的初始核酸扩增分析采用引物组 Gro-1(59-AAGAAGGA/CGTGATA-AC-39)和 Gro-2(59-ACTTCA/CGTAGCACC-3)。用于巢式 R 反应的引物组(TFL-1,59-ATATAT-CACAGTACTTTGCAAC-39 和 TR2,59-GTTC-CTAACTTAGATGTATCAT-39)产生一个 364 bp 的核酸扩增产物。针对 56 kDa 蛋白质基因的巢式核酸扩增实验利用引物 P34(59-TCAAGCTTATT GCTAGTGCAATGTCTGC-39)和 P55(59- AGGGA TCCCTGCTGCTGTGCTTGCTGCG-39)做外侧反应,再用巢式引物 P10(59-GATCAAGCTTC-CTCAGCCTACTATAATGCC-39)和 P11(59-CTAGGGATCCCGACAGATGCACTATTAGGC-39)扩增出一个 483 bp 的产物。靶向恙虫病东方体 *groEL* 基因的环介导等温 PCR 的发展提供了一种可用于资源缺乏地方的简单方法的可能性[97]。一项研究比较了等温核酸扩增联合生物光学传感器(iNAD)与 qPCR 的诊断敏感性,发现 iNAD 的敏感性和特异性分别为 100%和 90%。反应的特异性相当(iNAD 为 90%,TaqMan 为 95%),然而,在敏感性上观察到显著差异,iNAD 敏感性显著高于 *TaqMan*(100% *vs*. 67%)[98]。

七、分离

由于低剂量即有高度感染性,立克次体分离必须在生物安全 3 级实验室进行。除了恙虫病东方体常通过接种小鼠腹腔分离外[29,47],其他诸如接种成年雄性豚鼠、小鼠或鸡胚卵黄囊的繁琐的传统方法已被细胞培养方法所取代。在无抗菌药物的培养基中,Vero、L-929、HEL 和 MRC5 细胞用于分离立克次体。报道提示最好是在执行抗立克次体治疗前,已公布的最好结果是利用采集的肝素抗凝血浆、白细胞层或皮肤病变活检标本完成的。

将 0.5 ml 磨碎的临床标本和 0.5 ml 组织培养基混合,尽快接种至内含一直径 12 mm 有单层细胞汇集的圆形玻片、容积为 3.7 ml 的壳瓶内,室温下 700 *g* 离心 1 h,以增强立克次体对宿主细胞的吸附和进入[47]。移除培养液后,用磷酸盐缓冲液清洗壳瓶,加入含 10% 胎牛血清的基础必需培养基,在 34℃、5% 的 CO_2 的空气培养箱中孵育。在 48 h 和 72 h 时,通过吉姆萨或吉梅内斯染色,或是用抗斑点热群和伤寒群立克次体抗体的免疫荧光,观察玻片。

发现 4 个及以上病原体可解释为阳性结果。在来自既未接受治疗，也未对康诺尔立克次体产生抗体的南欧斑疹热患者的标本中，该方法达到的诊断率为 59%[47]。孵育 48 h 时，82% 阳性标本检出立克次体。利用壳瓶技术的试验证实在较低温度（28°C 或 32°C）下培养，对于一些疑似病原体，特别是猫立克次体和马赛立克次体有利[99-100]。当利用 qPCR 检测壳瓶培养液，有可能更早地检测到立克次体[99]。试验中应执行常规预防措施，戴手套、口罩，穿工作服，在生物安全柜内操作。虽然细胞培养中立克次体数量相对较少，但也要像对分枝杆菌、真菌和病毒一样，避免气溶胶、自身或接触性暴露。

与立克次体的种类一样，恙虫病东方体的培养和操作也需要专门的 BSL3 设施。为提高诊断效率，人们已经为在临床环境中安全培养恙虫病东方体而做出努力。将 21 例患者血清（恙虫病东方体定量 PCR 呈阳性）接种于含人类细胞的血液培养基中培养。血液培养为期 7 天，每天取样并进行定量 PCR 分析。细菌负荷在培养前 5 天达到高峰，85%的样本经定量 PCR 检测呈阳性。这种方法将有可能用于从偏远地区运送到更大的医疗设施的患者样本[101]。

八、立克次体属的识别和东方体属的分离

细胞培养分离的立克次体可以用群、种、株特异性单克隆抗体通过间接免疫荧光法鉴定。立克次体属分离株常用诸如属特异性基因[17 000 蛋白质、枸橼酸合成酶（*gltA*）基因 或 *sca*5] 或 斑点热群特异 性（*sca*0）基因核酸扩增的分子生物方法鉴定[80]。DNA 序列的确定鉴别出了独特的分离株。与立克次体物种亲缘关系较远的恙虫病东方体，缺乏上述细胞壁基因，但可以通过对主要免疫显性 56 kDa 的表面蛋白基因，47 kDa 蛋白基因，*groEL*，或 *rrs* 的编码基因的核酸扩增实验被鉴定[54,97]。

微量免疫荧光血清分型法鉴定立克次体分离株，需要在第 0 天和第 7 天小鼠静脉内接种立克次体并在第 10 天收集血清。高滴度的抗体与种特异性构象的 OmpA 和 OmpB 抗原表位反应。在小鼠对高剂量的立克次体发生免疫反应后会产生抗群特异性的脂多糖抗体。这种鉴定方法繁琐且昂贵，需要培养大量的分离株和原型菌株用于免疫荧光滴定，以及分型血清的研发。目前，对于菌株鉴定，优先选择遗传分析。已知属于立克次体种的分离株应在生物安全 3 级实验室鉴定。普氏立克次体 R 分离株必须遵循美国联邦法规对限制性病原体（select agents）管理规定进行处理。

九、血清学试验

对于大多数临床微生物实验室，唯一开展的试验方法是检测立克次体抗体。这种状况对于威胁生命的、感觉严重不适的立克次体病患者不利。因为这些检测方法主要是针对恢复期血清学诊断，通常不能在疾病急性期制定关键治疗决策中提供有用的信息。立克次体病死亡患者，通常曾接受许多抗菌药物治疗，但其中没有任何药物具有抗立克次体活性。导致这种状况的部分原因是缺乏实验室数据为临床诊断提供指导。立克次体病诊断越早确立，在使用适当的抗立克次体抗菌药物后，立克次体病程就越短。

诊断立克次体感染血清学试验主要是“金标准”——IFA。其他方法学包括间接免疫过氧化物酶法、乳胶凝集、酶免疫测定（enzyme immunoassay，EIA）、普通变形杆菌 OX-19 和 OX-2，以及奇异变形杆菌 OX-K 凝集（外-斐热凝集素）、线印迹法（line blotting）、蛋白印迹法和快速侧流分析（rapid lateral flow assays）[28-31,62,102-108]。这些试验中仅有部分方法有商品化试剂盒或在参考实验室可用，而且它们不是对于所有的立克次体疾病有用。其他血清学方法，如间接血凝试验、微量凝集反应、补体结合试验已不常用。

间接免疫荧光试验涵盖了所有立克次体热不稳定性蛋白抗原和群共有性脂多糖抗原，因而，提供了群反应性血清学（检测方法）。针对斑点热群和伤寒群立克次体的间接免疫荧光试剂可选用来自 Scimedx Corp（Denville，NJ）、Focus Technologies（Cypress，CA）和 Fuller Laboratories（Fullerton，CA）的商品；针对恙虫病东方体还可选用来自于 Scimedx Corp 和 Fuller Laboratories 的商品。在落基山斑点热病例中，通常在病程的第二周，间接免疫荧光试验可检测到≥64 的抗体滴度。落基山斑点热的抗立克次体有效治疗必须在病程

前 5 天开始，以避免潜在的致命后果。对于南欧洲斑疹热患者，有 46% 在病程的第 5～9 天、90% 在第 20～29 天，以及此后的 100% 患者体内出现≥40 的间接免疫荧光试验滴度。对于鼠型斑疹伤寒，从开始至第一周末，间接免疫荧光试验滴度会出现在 50%的病例中，到第 15 天，出现在几乎所有病例中。特定立克次体病流行地区需要更高的诊断临界滴度(cutoff titer)。例如，根据改良的恙虫病感染标准的定义，用间接免疫荧光试验诊断丛林斑疹伤寒，IgM 间接免疫荧光试验入院滴度阈值需要≥3200，或者需要比成对恢复期样本有 4 倍以上直至≥3200 的升高[76,109]。采用改良的恙虫病感染标准，IgM-间接免疫荧光试验的敏感性和特异性分别为 81.6% 和 100%[109]。开展该检测的每个实验室应该针对患病群体、所使用的显微镜和试剂，以及技术人员对最小阳性信号的判定，建立自己的诊断临界滴度。应用于丛林斑疹伤寒诊断的间接免疫荧光试验血清学试验的荟萃分析得出推荐使用基于滴度 4 倍及以上增长的诊断(标准)而不是单依靠抗体滴度的诊断标准，除非前期研究已确定了当地人群血清阳性率，论证过滴度临界值[110]。

应用于灌木丛伤寒、鼠伤寒、南欧洲斑疹热及其他可能的立克次体病的间接免疫过氧化物酶试验与 IgG 诊断滴度设定在 128、IgM 设定在 32 时的间接免疫荧光实验产生的结果类似[111]。其优点在于，间接免疫过氧化物酶试验使用光学显微镜而非荧光显微镜，可获得长久的玻片结果。在美国仅应用于立氏立克次体的乳胶凝集试验试剂可使用来自 Scimedx 公司的商品。据报道，被提取的含立克次体脂多糖的立克次体蛋白质-碳水化合物复合体包被的乳胶颗粒主要与 IgM 抗体发生凝集，敏感性为 71% ～ 94%，特异性为 96%～99%[105]。在病程第 2 周初期常检测到的诊断滴度为 128。

酶免疫测定已发展为包括抗原包被于微孔，或固定在硝化纤维上，或一些商业参考实验室使用的其他固相上在内的多种形式。与用于诊断的鼠型斑疹伤寒≥64 的间接免疫荧光试验滴度相比，斑点酶免疫测定显示出的敏感性为 88%，特异性为 91%[112]。与用于诊断灌木丛伤寒滴度阈值为 64 的间接免疫荧光试验相比，斑点酶免疫测定敏感性和特异性仅分别有 80% 和 77%，而当间接免疫荧光试验滴度阈值在 128 时，分别有 89% 和 66%[113]。依靠临床和流行病学数据，在一次的非洲蜱咬热暴发中证实了这些斑点热群和伤寒立克次体试剂盒检测到了交叉反应抗体。应对康诺尔立克次体抗原的斑点酶免疫测定为斑点热群立克次体病提供了早期诊断证据。随后的分析显示，该方法假阳性率高，特异性差。这些诊断方法不需要昂贵、专用的设备，但遇到明显的低特异性(问题)。可用于检测抗斑点热群和伤寒立克次体的 IgG 或 IgM 抗体的标准化酶免疫测定试验源自 Fuller 实验室，而那些可用于检测抗恙虫病东方体抗体的测定试验源自 InBios 国际公司。用这种方法检测与立克次体病相符的临床表现(发热、头痛或皮疹)、流行病学特征(媒介暴露)患者成对血清，很可能获得有用信息[114-117]。应用于灌木丛伤寒、鼠伤寒、钩端螺旋体病的斑点酶免疫测定多种检测在泰国没有用处，那里几乎所有患者体内均有针对一种以上病原体的抗体而另一些患者体内有抗某种病原体的抗体，但该病原体不是造成疾病的原因[118]。在 IgM 捕获酶联免疫吸附试验中，通过检测临床样本中的抗体诊断斑疹伤寒可用于感染早期的单份血清样本(测定)[106]。该试验敏感性为 96.3%，特异性为 99%。用于斑疹伤寒的血清学方法间的比较显示包含 Karp、Kato 和 Gilliam 菌株重组 p56 蛋白的酶免疫测定敏感性最高(100%)，抗重组 Karp p56 的抗体的快速侧向层析实验有 86%的敏感性[106]。后者特别适用于实验设施有限，标本量少的实验室，可使用来自 InBios (Seattle, WA)的产品。

针对立克次体病诊断，既往最为广泛使用的实验方法是用于伤寒和斑点热感染的普通变性菌 OX-19 和 OX-2 菌株，以及用于恙虫病东方体感染的奇异变形菌 OX-K 菌株的聚集(反应)。这些试验的敏感性和特异性差[62]。它们应被诸如间接免疫荧光试验或酶免疫测定方法的更准确的血清学方法替代。然而，在发展中国家，存在(一些)情况。在那里，对于诸如虱传斑疹伤寒暴发的重大公共健康问题的检测只在变性菌凝集实验和不做任何实验之间进行选择[119]。事实上，导致日本斑点热(Japanese spotted fever)和弗林德斯岛斑点热(Flinders Island spotted fever)被发现的证据包括变形杆菌发生凝集的抗体。

共同抗原 OmpA、OmpB 和群特异性(group-

specific)脂多糖阻碍了种特异性血清学诊断方法的建立。在2种疑似病原体之间，以4倍及以上的间接免疫荧光抗体滴度差异的标准仅能在34%的病例中区分普氏立克次体与伤寒立克次体感染，仅能在26%的病例中区分非洲立克次体与康诺尔立克次体[31,120]。以免疫印迹法检测仅针对一种立克次体种的抗OmpA或OmpB抗体也作为种特异性诊断标准被提出，然而，仅在半数病例中，它能有效地区分普氏立克次体和伤寒立克次体感染或非洲立克次体和康诺尔立克次体感染[31,120-121]。在间接免疫荧光或免疫印迹试验前进行烦琐、昂贵的血清交叉吸收试验有助于更有效地建立种特异性诊断。然而，这些结果的解释需要仔细评估有效质控物的性能、每个抗原制备物的质量和数量，以及由未检出，甚至尚未发现的病原体引起的感染发生的可能，或甚至未知抗原的潜在感染。既往认为，了解病例地域性源头足以代表种特异性诊断，然而，立克次体种类增加和地域重叠对以前的假设提出了挑战。来自于虱传斑点热而非落基山斑点热，立克次体疱疹或鼠伤寒患者的血清与猫立克次体OmpA重组片段发生反应的报道表明种特异性肽段抗原也许能被识别并整合到可以更精准地确认疾病的试验方法中[122]。

十、抗菌药物敏感性

鼓励使用多西环素或另一种四环素类抗生素作为治疗立克次体物种造成的感染的可选药物，以及氯霉素作为替代药物的数据主要来自于经验治疗、回顾性病例研究和部分前瞻性研究[123-128]。测定这些专性胞内细菌的体外敏感性的技术并不像测定其他细菌那样标准化。除了抗菌药物对这些感染动物和鸡胚中的专性细胞内寄生细菌作用活性的历史研究之外，抗菌药物在细胞培养基中的有效性研究鼓励四环素和氯霉素的使用[129]。体外研究也鼓励考虑诸如氟喹诺酮类原料药、阿奇霉素、克拉霉素、交沙霉素、泰利霉素(后2种不可以在美国使用)的备选药物[129-130]。在某些情况下，几种氟喹诺酮类药物、交沙霉素和阿奇霉素确实已成功用于治疗南欧洲斑疹热，但尚不能推荐用于更多病原性立克次体病的治疗[123,126,131]。在临床试验中，诸如环丙沙星的氟喹诺酮类药物，阿奇霉素、克拉霉素的大环内酯类药物也能有效地用于治疗地中海斑点热。患有鼠伤寒患者的回顾性研究证实，环丙沙星是一种有效的药物。

体外敏感性并不总是预测疗效，例如，就利福平而言，不同种立克次体的最低抑菌浓度在0.06～1.00 μg/ml，但是在一个小型试验中的几次失败排除了推荐其临床应用的建议[129,132]。几乎没有对立克次体产生抗生素药抗性的关注。氯霉素已被用于妊娠期间落基山斑点热的治疗，但现在在美国很难推行。既然没有数据支持多西环素(强力霉素)会出现像四环素一样，对正在发育的胎儿造成伤害情况，那么对于落基山斑点热的益处远远大于风险[133]。交沙霉素和阿奇霉素可考虑用于患有稍轻的严重性立克次体病(如布托纽斯热)的妊娠期妇女。立克次体的药敏研究不是常规开展的临床实验室检查。与前面提到的立克次体一样，多西环素是恙虫病东方体感染的备选药物。虽然效果稍差，但是氯霉素长期以来一直作为替代药物使用。阿奇霉素也是一种有效的替代品[134-135]，并已在泰国成功用于对多西环素或氯霉素没有反应的恙虫病个例[136-137]。与在立克次体种间的情况不同，临床上，利福平在那些患有恙虫病的患者中似乎有效[138]。恙虫病东方体对氟喹诺酮类药物天然耐药[139]。已有一些研究通过使用流式细胞术分析被感染的、经过强力霉素处理并被抗单56 kDa外膜蛋白的线性表位单克隆抗体染色的单细胞层，来改良恙虫病东方体的抗生素药敏试验[140]。尽管此方法表现很成功，但目前仅限于BSL3设施中使用。

十一、结果的评价、解释及报告

当汇报针对单份血清样本中抗体的试验结果时，实验室人员很少知道血清样本是来自急性期抑或是恢复期。对于斑点酶免疫方法检测无反应性、间接免疫荧光血清稀释度为1:64、间接免疫过氧化物酶法稀释度为1:128、乳胶凝集法稀释度为1:64，或者外斐变形杆菌凝集滴度为1:160的血清，实验室报告单应注明在指定临界稀释度下未检出抗体，检测结果可能在某些实验室之间和某些患病群体之间可能不同；阴性结果可能出现在立克次体病的急性期；如果尚未建立替代诊断方法，应采集第二份标本用于评估血清转

化的可能性。

如果能够使用凭借适当的时间间隔分离得到成对的急性期和恢复期血清，它们应该同时测定。如果患者在美国可能暴露/接触立克次体和埃立克体抗原，检测针对所有的立克次体和埃立克体的抗原是明智之举。除非去过有恙虫病或者非洲虱热的地区，斑点热立克次体病、查菲埃立克体、嗜吞噬细胞无形体和伤寒立克次体也是可能的病原体。

如果双份血清均为阴性，报告单应该注明，检测结果不支持立克次体感染，但偶尔出现，特别是在伴有早期抗立克次体治疗的病例中抗体合成延迟的情况[141]。

如果单份血清样本含有≥64的间接免疫荧光抗体滴度，≥32的间接免疫荧光IgM抗体滴度、≥128的间接免疫过氧化物酶法抗体滴度、≥64的乳胶凝集滴度，或≥320的外斐滴度，实验室报告单应该说明在测试滴度内可检测到抗体与指定的立克次体抗原反应，本结果为立克次体病诊断提供支持性证据，恢复期样本应该被送检以评价抗体滴度诊断性升高的可能性。反应性单份血清IgM样本可能出现问题。在一项对来自落基山斑点热流行地区个体的研究中，IgM对立氏立克次体的血清反应没有预见性的后续的IgM滴度动态升高或IgG血清转化的出现[141]，如果同时检测的双份血清效价升高4倍或更高，应解释为该结果强烈支持所测抗原指示的立克次体诊断。如果急性期样本检出有显著的高水平滴度，但在没有或仅仅测量到双倍稀释度的增长时，报告单应注明附加的后期样本应被用于检测以评估滴度4倍上升或下降。借助对普氏立克次体IgM抗体及OX-19凝集抗体的缺失区分再燃性斑疹伤寒与先前的虱传斑疹伤寒（的方法）受到挑战[104]。斑点酶免疫实验生产商推荐的解释是强反应性样本（3或4个点）可能表明存在特异性抗体反应，弱反应性样本（1或2个点）不常见，但可能在正常人群中出现。如果恢复期血清出现3或4个点，2～3周后重新检测应该能够确诊，并且应经常复查。在美洲钝眼蜱地域分布范围内，超过10%的健康人群拥有与斑点热群立克次体反应的抗体，并且落基山斑点热患者一般在疾病的第1周内不能产生针对立氏立克次体的抗体，因此，这段时间检测到的抗体可能先于发热疾病而存在。

从血液或组织中分离出立克次体，可以解释为一种致病要素。应注明分离株的鉴定水平，即仅鉴定为斑点热群或是伤寒群，抑或是到种水平。

免疫组化和免疫细胞学诊断性解释要说明检测方法及方法的反应性（如抗体与斑点热群立克次体反应）和抗原位置（对于立氏立克次体，在血管内皮和常发生的邻近的血管平滑肌）。在血管内皮活检组织标本检测到3个或更多的立克次体或在捕获的循环内皮细胞中检测到4个或更多立克次体，可对于立克次体感染有诊断性。

核酸扩增检测结果说明应注明所测病原体目标基因及DNA产物的存在或缺失。如果特定寡核苷酸探针或DNA序列确认鉴定的特异性，应在结果中注明。对于免疫组化、免疫细胞学和核酸扩增的阴性结果，应注明未检出病原体，不排除诊断，并同时注明在指定实验室内试验敏感性和特异性相关数据及抗立克次体治疗对敏感性的影响信息，还要考虑特定实验室中检测方法的敏感性和特异性，以及抗立克次体治疗对敏感性的影响。

应格外注重明确死亡病例的诊断，其中包括对尸检采集的样本进行立克次体分离、免疫组化检测、核酸扩增试验和血清学试验。

参考文献请扫二维码查阅

第67章　埃里希体属、无形体属和相关胞内寄生菌

BOBBI S. PRITT, J. STEPHEN DUMLER

（苏丹虹　译；韩立忠、穆红　审校）

立克次体目中的无形体科由涵盖人类和动物病原体中具有临床意义的几个属组成[1]。埃里希体(*Ehrlichia*)和无形体(*Anaplasma*)属的成员是最著名的，一个多世纪以来一直被认为是重要动物病原体，自1987年以来被认为是人类病原体[2-3]。新立克次体属和"新球菌"属的成员也已知是人类和动物病原体，而沃尔巴克体属是大多数人类丝虫的重要内共生体[4-6]。本章将侧重于无形体属(*Anaplasmataceae*)的临床相关成员，特别着重于嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*)和埃里希体(*Ehrlichiachaffeensis*)，这是该家族中最常见的人类病原体。

一、分类学

无形体科是专性胞内寄生菌，归类为α-变形菌门(Proteobacteriaphylum，alphasection)，立克次体目(*orderRickettsiales*)。立克次体的分类学分类(图67-1)主要基于*rrs*(16S rRNA基因)和*groEL*(热休克操纵子)的序列分析[1]，并越来越多地利用全基因组测序[7]。血清学交叉反应，主要免疫显性表面蛋白相似性，以及这些细菌的细胞嗜性进一步支持系统发育的分类方法[8-9]。*rrs*序列的微小差异成为它们生物学和生态学的区别标志[10-12]。例如，在美国东北部和欧洲，嗜吞噬细胞无形体(*Anaplasma phagocytophilum*)的遗传变异体存在于虱和哺乳类动物体内，包含一些可能不引起人类疾病的物种[12-13]。

二、埃里希体(*Ehrlichia*)和无形体(*Anaplasma*)属的描述

无形体科(*Anaplasmataceae*)为细小、无动力、多形态的专性细胞内寄生菌，它们在细胞膜包被的囊泡处驻留和繁殖[14]。该家族至少分为4个主要进化支，分别代表不同的属：埃里希体、无形体、沃尔巴克体和新立克次体[1]。该菌属还包括"*Candidatus Neoehrlichia*"，其中包含人类病原体："*Candidatus Neoehrlichiamikurensis*"[5]和可能的埃及小体(*Aegyptianella*)属(目前分类为incertaesedis，分类学地位仍不确定)，与无形体关系最为密切[15]。尽管它们是革兰阴性菌，但部分无形体科属(如埃里希体、无形体和新立克次体)缺乏脂多糖(内毒素)和肽聚糖合成所需的基因[16]。表67-1描述了无形体科中选定的人类和兽医病原体的重要特征。

除沃尔巴克体(*Wolbachia* spp)属外的其他无形体属可以在脊椎动物宿主细胞中繁殖，并具有至少一种已鉴定的无脊椎动物载体宿主[14]。脊椎动物宿主中最常见的感染细胞是造血起源的。无形体和埃里希体感染不同动物宿主中不同造血谱系的细胞，包括粒细胞、单核细胞、红细胞和血小板[14]。其他埃里希体属物种(如反刍埃里希体，*E. ruminantium*，*E. muris*)也感染内皮细胞。新立克次体主要感染哺乳类动物宿主单核吞噬细胞，偶有感染肠上皮细胞[17-18]；沃尔巴克体(*Wolbachia* spp)感染节肢动物和蠕虫性腺细胞[19-20]。细菌通过黏附和内吞作用进入宿主细胞。当它们在细胞囊泡中繁殖时，它们形成"桑椹样"的簇，称为桑椹体(*L. morum*，mulberry)(图67-2)，其在光学显微镜下可见[14]。持续的繁殖最终会导致细胞裂解或胞吐作用并释放细菌，从而继续感染其他易感细胞[21]。细胞质囊泡的特征，包括与宿主细胞线粒体和内质网的关系，被封闭细菌的数量及细菌是否包含在纤维基质中，因属而异[14,22-25]。

透射电镜研究表明，无形体、埃里希次体和新立克次体有2种不同的形态：①致密型：一种

0.2～0.4 μm 小致密颗粒体；②网状体型：0.8～1.5 μm 的大网状体（无形体、埃里希体）或"较轻体"（新立克次体）[22]。无形体和埃里希体与细胞吸附相关的特异性配体在感染性的致密型上的表达有差异，而在代谢活跃的网状体型上不表达。致密型和网状体型均能进行二分裂。这表明传染性形式与非传染性形式是异步发展的[23]。沃尔巴克体菌种在受感染宿主中也表现出多形形态，表现为小球体型（直径 0.25～1.00 μm）和椭圆体型（长 0.5～1.3 μm）[20]。Candidatus 三仓岛新埃立克体（*Candidatus Neoehrlichiamikurensis*）在被感染的啮齿动物的内皮细胞中已观察到"小球菌"是小的球菌[5]。

与其他立克次体一样，无形体科成员的基因序列比普通细菌有所变小，依靠宿主细胞功能进行生存。现已建立了 75 个以上立克次体种属（不包括沃尔巴克体 Wolbachia）的鸟枪法测序全基因组图，这些成员的基因组长度范围从腺热新立克次体（*Neorickettsiasennetsu*）的 0.86 Mb 到查菲埃里希体的 1.18 Mb 和嗜吞噬细胞无形体的 1.77 Mb[16]不等。基因组测序证实，无形体科（边缘无形体，*Anaplasmamarginale* 除外）与内共生菌一样具有低 G+C 含量和大部分的非编码序列[16]。与其他细胞内细菌的还原性进化不同，无形体科存在许多同源性基因，这说明了部分基因重复的发生[16]。连续重复序列的主动复制可能导致编码外膜蛋白的新基因的出现，也可能导致抗原变异、免疫逃避，从而提高生存率。无形体科也拥有一个部分重复的基因编码的异常Ⅳ型分泌系统，该系统最有可能编码毒力相关因子，可能是通过将效应子运输到宿主细胞中，或通过 DNA 吸收或接合[26]。

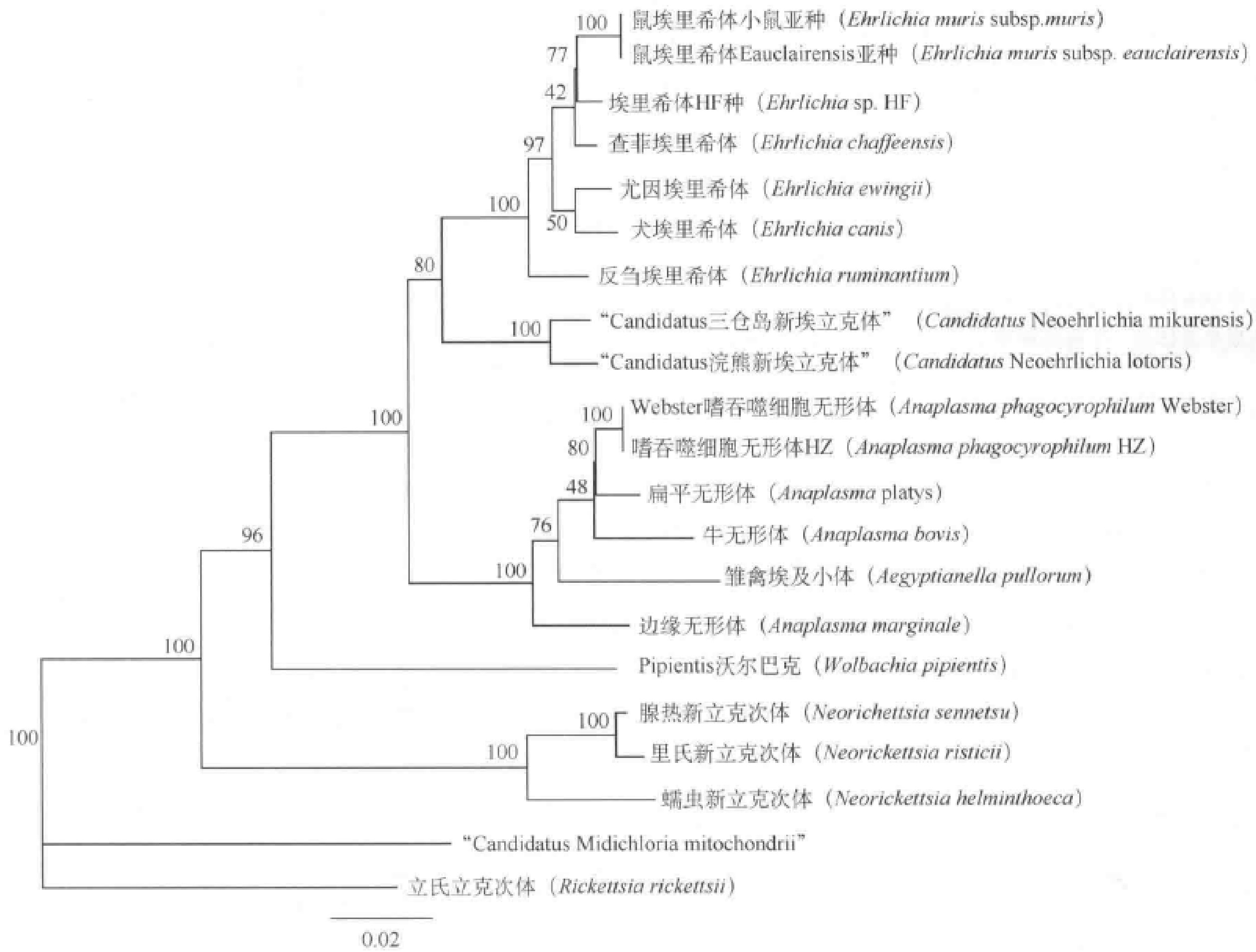


图 67-1　从选定的 Ehrlichia，"Candidatus Neoehrlichia"，Anaplasma，Neorickettsia 和 Wolbachia spp. 的 rss(16S 核糖体 RNA 基因）序列推论出的邻接的进化树。进化距离用田村-Nei 模型计算。立克次体被用作外部分组，节点上显示了 1000 个重复的引导值。比例尺代表每个核苷酸位置的取代。图片由 Sandor Karpathy 博士提供

表 67-1 埃里希体、无形体、新立克次体、"*Candidatus* 三仓岛新埃立克体"和埃及小体与人畜共患疾病相关的特点

病原体	传播媒介	地理分布	疾病	发病宿主	感染细胞	保存宿主
无形体属						
嗜吞噬细胞无形体	全沟硬蜱群、*Haemaphy saliscon cinna* longicornis 血蜱	亚洲、欧洲、北美洲	EGE、蜱传热(反刍动物)人粒细胞无形体病(HGA)	人、马、反刍动物、犬	粒细胞(中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞)	小型哺乳动物(白足鼠、花栗鼠、田鼠)、鹿绵羊、牛、山羊
边缘无形体、中央无形体、羊无形体	Several 蜱和机械性媒介	非洲、中东、欧洲、北美洲	反刍动物无形体病	牛及其他反刍动物	红细胞	反刍动物、野生鹿科动物?
扁平无形体	血色扇蜱	美国、委内瑞拉	犬循环性血小板减少症	人、犬	血小板	犬科动物、反刍动物?
牛无形体	Several,包括附尾扇头蜱(*Rhipicephalus appendiculatus*)、彩饰钝眼蜱	非洲、中东、北美洲、南美洲	牛埃立克体病	牛	单核细胞	反刍动物? 兔子?
埃里希体属						
查非埃里希体	美洲钝眼蜱	美国、委内瑞拉、巴西	查非埃里希体病(*E. chaffeensis* ehrlichiosis)	人、犬	单核细胞	白尾鹿、家犬、啮齿动物、鸟?
尤因埃里希体	美洲钝眼蜱	美国	CGE、尤因埃里希体病(*E. ewingii* ehrlichiosis)	人、犬	粒细胞	白尾鹿、犬?
犬埃里希体(包括委内瑞拉人类埃里希病毒株)	血色扇蜱	委内瑞拉、哥斯达黎加	CME、VHE	人、犬	单核细胞	犬
反刍埃里希体	钝眼蜱种	加勒比海、南部非洲	Heartwater	家养的和野生的反刍动物	粒细胞、红细胞	反刍动物
小鼠鼠埃里希体(*Ehrlichiamuris-muris*)	黄色血蜱(*Haemaphysalis flava*)、全沟硬蜱	亚洲、东欧	鼠埃里希体病(*E. muris* ehrlichiosis)	小型哺乳动物、人类、犬? 熊? 猴? 野猪?	巨噬细胞	啮齿动物、梅花鹿
eauclairensis 鼠埃里希体(*Ehrlichiamuri seauclairensis*)	肩突硬蜱	美国上中西部(明尼苏达州、威斯康辛州)	鼠埃里希体病(*E. muris* ehrlichiosis)	人	巨噬细胞? 红细胞?	啮齿动物
埃里希体种(*Ehrlichia* species, IOE)	卵形硬蜱	日本	未命名	实验室和野生的啮齿动物	巨噬细胞、枯否细胞、内皮细胞	未知
新立克次体						
腺热新立克次体	未知,可能通过感染吸虫病的鱼摄入	马来西亚、日本、亚洲其他地区	Sennetsu 热(Sennetsu fever)	人	单核细胞	吸虫病鱼? 蜗牛?
里氏新立克次体	通过感染吸虫病的鱼摄入、蜗牛	北美洲	Potomac 马热(Potomac horse fever)	马	单核细胞、红细胞、肥大细胞?	蜗牛、水生昆虫
蠕虫新立克次体	感染吸虫病的鲑鱼	美国西北太平洋沿岸、巴西?	鲑鱼中毒病(Salmon poisoning disease)	犬、熊?	单核细胞、巨噬细胞	蜗牛、吸虫病鱼、陆巨螈(Pacific giant salamander)

（续 表）

病原体	传播媒介	地理分布	疾病	发病宿主	感染细胞	保存宿主
不确定种属或 *Candidatus* 状态						
Spp. 埃及小体	眼蜱、*persicus* 锐缘蜱	埃及、北美洲	埃及小体病（Aegyptianellosis）	鸟、两栖动物、爬行动物	红细胞	未知
羊无形体	全沟硬蜱？	中国	羊无形体病（*A. capra* anaplasmosis）	山羊、人	未知	山羊
Candidatus 三仓岛新埃立克体	蓖子硬蜱、卵形硬蜱、全沟硬蜱、血蜱？（*Haemaphysalis* spp.）	亚洲、北欧	新立克次体病（Neoehrlichiosis）	人、啮齿动物	红细胞、粒细胞	啮齿动物
Candidatus 浣熊新埃立克体	spp 硬蜱？	北美洲	不发病	浣熊	未知	浣熊

注：改编自 Juan P. Olano 和 Maria E. Aguero-Rosenfeld 所著的本手册第9版的第67章[156]。EGE. 马粒埃里希体病；HGA. 人粒细胞无形体病；HME. 人单核埃里希体病；CGE. 犬粒埃里希体病；CME. 犬粒埃里希体病；VHE. 委内瑞拉人埃里希体病

三、流行病学和传播

埃里希体、无形体和“*Candidatus* 新埃立克体”是动物传染病病原体，通过蜱传染给动物和人类。腺热新立克次体（*N. sennetsu*）和沃尔巴克体属（*Wolbachia* spp.）很少引起人类疾病。人们认为，*N. sennetsu* 不是蜱虫传播，人类可能通过摄入携带了 *Neorickettsia* 吸虫感染的鱼类而感染[18,27]。沃尔巴克菌属目前还不知道是否会引起人类疾病，但它们是广泛的节肢动物、蠕虫和甲壳类动物的重要共生体，包括可致病的丝虫[19-20]。它们存在于丝虫、线虫的各个阶段，并可能在蠕虫卵巢感染后垂直传播[28]。

当幼虫或蛹以被感染的动物而获得细菌，如果食入这些细菌，就会感染埃里希体、无形体和“*Candidatus* 新埃立克体”。这些微生物在蜱内不发生经卵巢传播，但会在过龄期、间隙间期和间隙期传播。蜱虫幼虫或蛹叮咬感染动物而获得细菌，在其下一发育阶段（蛹或成虫）叮咬另一哺乳动物宿主而发生传播。蜱虫和哺乳类动物作为贮菌所，其中，哺乳类动物菌血症持续存在[29-30]，相比之下，人类只是无意中被感染，并作为终末期宿主。因此，自然界中蜱传感染的维持依赖于合适的蜱虫媒介和局部环境的哺乳动物宿主的存在[30-32]（表67-1）。每种蜱传感染的流行病学反映了相关媒介和宿主的季节性活动和地理分布。在美国，大多数埃里希体病和无形体病的报告时间为4至9月，与蜱媒宿主寻找和取食活动的峰值水平一致[33-35]。

1. 人粒细胞无形体病 人粒细胞无形体病（HGA）；曾用名人粒细胞埃里希体病（HGE），是蜱传人类疾病中最广泛的一种，为由无形体科（*Anaplasmataceae*）引起的疾病。它是由嗜吞噬细胞无形体（*Anaplasma phagocytophilum*）引起的，大多数病例发生在美国、加拿大、欧洲（主要是斯堪的纳维亚半岛和中欧）和亚洲东部地区[36-37]。嗜吞噬细胞无形体引起的疾病主要由硬蜱介导，包括美国东北部和中西部上部的肩胛硬蜱（黑腿蜱）、美国西北部的太平洋黑腿蜱和欧洲的蓖麻蜱（蓖麻豆蜱），而全沟蜱（taiga tick）是亚洲最有可能的昆虫媒介。重要的是，这些蜱类也是 *Borrelia burgdorferi sensulato complex*（莱姆病病原体）和几种病毒、细菌和寄生虫的载体；其中不止一种病原体可以在取食时被蜱类传染给宿主[35,38]。较不常见的传播途径是意外接种感染血液[39-40]、输血[41]和围产期传播[42]。

HGA 首次诊断是在1990年，美国威斯康辛州（Wisconsin）1例蜱叮咬患者，直到1999年它才在美国成为全国通报的疾病[35]。美国疾病预防控制中心（CDC）报告了8896例确诊或可能的 HGA 病例，发病日期在2008至2012年之间[33,38]。在报告期内的大部分时间里，病例数每年都在增加，年病率6.3例/1 000 000人，这使HGA成为仅次

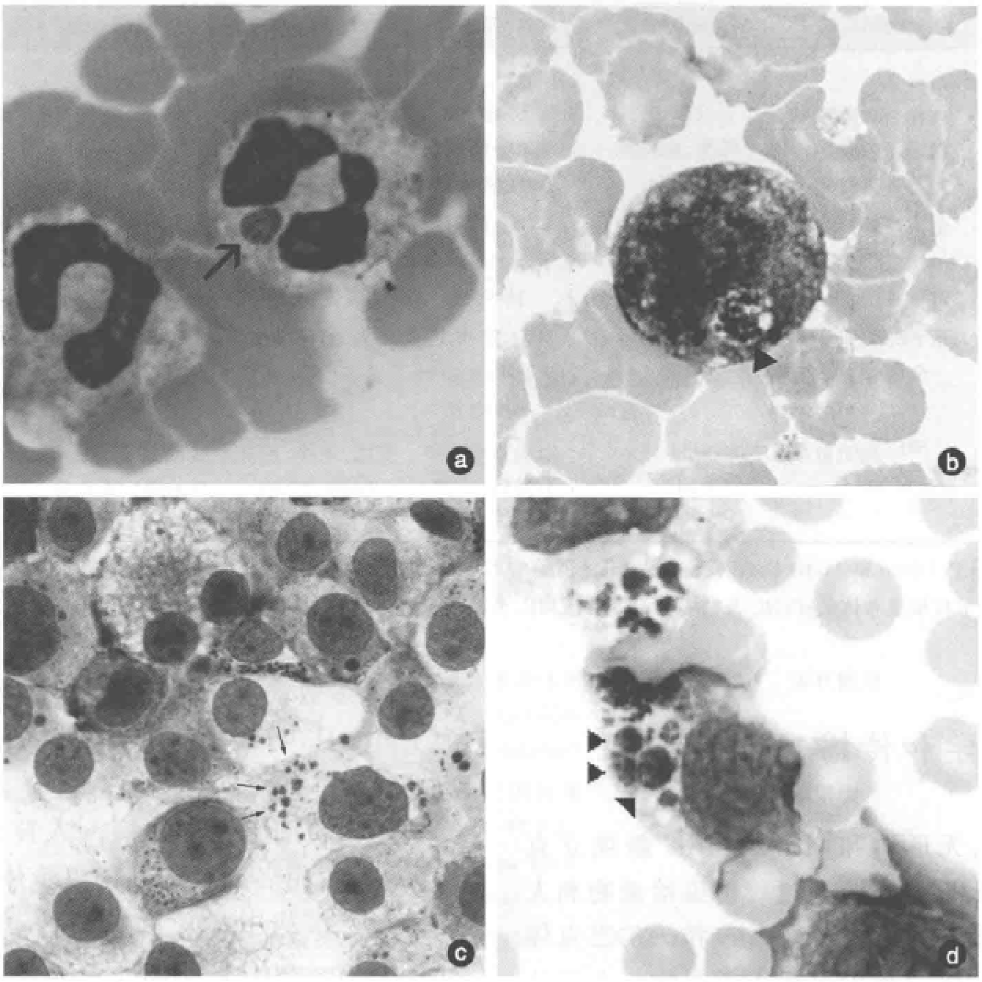


图 67-2 外周血白细胞培养的嗜吞噬细胞无形体(*A. phagocytophilum*)(a)和查菲埃里希体(*E. chaffeensis*)(b)的 Wright 染色(原放大倍数 31 000)

注:a. 嗜吞噬细胞无形体的桑椹体(箭头所指)存在于中性粒细胞中;b. 查菲埃里希体的桑椹体(箭头方向)则存在于单核细胞中;c. 犬组织细胞 DH82 细胞系培养的查菲埃里希体,Romanowsky 染色(Leukostat)(原始放大倍数×1000)。值得关注的是,嗜碱性、带彩点、在细胞质内 2~3 mm 直径的内含体(箭头所指)。这些细胞质内更小的斑点也可能是桑椹体;d. 在人早幼粒细胞系 HL-60 培养一个受感染患者血液中的嗜吞噬细胞无形体,Wright 染色(原始放大倍数×1000)。需注意的是,在 HL-60 细胞里,有多重嗜碱性、带彩点、存在于胞浆内的内含体,见彩插

于热立克次体病(fever rickettsiosis)的美国第二大最常见的立克次病[33,38]。美国 38 个州和纽约市都报告了病例,大多数病例分布在中西部和东北沿海各州。每百万人发生病率最高的州是明尼苏达州(97.3),威斯康辛州(79.1)和罗德岛州(51.1)[33]。发病率随年龄增长而增加,其中 65 岁以上的人发病率最高。总体男女比例为 1.4∶1.0。值得注意的是,HGA 具有双峰季节性:症状发作主要在春季和夏季(5—8 月),与若虫的寻宿主行为的高峰时间相对应,但在 10 月的病例高峰较小,与成年蜱虫宿主寻求相对应[33,38]。

尽管有报告美国不同地理区域的疾病风险评估的重要信息,但它可能低估了 HGA 的真实流行率,因为许多患者患有亚临床或轻度疾病而未被统计。在过去 20 年中,对居住在美国非贫困地区的居民和献血者的血清进行的研究表明,血清流行率为 0.5%(威斯康辛州献血者)、3.5%(康涅狄格州献血者)、5.1%(居住在纽约州韦斯特切斯特县正接受内分泌紊乱检测的儿童),11.3%(纽约州韦斯特切斯特县,献血者)和 14.9%(威斯康辛州居民)[43-45]。值得注意的是,14.9%的威斯康辛州居民血清学结果呈阳性,但没有一个有 HGA 的病史,表明他们的感染是轻微的或亚临床的,并且测试结果与蜱虫叮咬史之间没有关联[43]。其他研

究显示，有蜱虫叮咬迹象的患者血清阳性率较高，其中35.6%的成年人生活在韦斯特切斯特县，23.3%的标本提交给加拿大马尼托巴省温尼伯市的大型参考实验室进行莱姆病检测，发现与嗜吞噬细胞无形体（*A. phagocytophilum*）反应的抗体呈阳性[44,46]。在欧洲，献血者报告的血清流行率从0～2.9%不等，而报告蜱虫感染患者血清流行率更高（1.5%～21.0%）[37]。

嗜吞噬细胞无形体的主要贮菌所通常是白足鼠（*Peromyscus leucopus*）、金花鼠（*Tamiasstriatus*）、田鼠（*Clethrionomys gapperi*）、野生啮齿类等小哺乳动物。尽管嗜吞噬细胞无形体能持续感染白尾鹿，但天然感染鹿的嗜吞噬细胞无形体菌属（AP变种1）对小型动物没有传染性，这种感染性在人类尚未证实，可能代表非致病变种[47]。动物源宿主持续或长期感染是人畜共患病如HGA的重要因素。嗜吞噬细胞无形体感染小鼠传染性会持续数月，可以传播给不同发育阶段的*I. scapularis*蜱虫[48]。在欧洲，马鹿、绵羊、牛和山羊会持续感染嗜吞噬细胞无形体，并作为它的贮菌所。

已有2种其他种类的无形体感染人类的报道，其中包括28例中国感染*Anaplasma capra*的患者和塞浦路斯的1例感染*Anaplasma ovis*的患者[49-50]。

2. 人埃里希体病 大多数人埃里希体病例发生在美国，三种主要病原体是查菲埃里希体、尤因埃里希体和*Eauclairensis*鼠埃里希体。其他埃利希亚种在美国和世界其他地区也有报道可引起人类疾病[51-52]；表67-1列出了重要的人类病原体。该类疾病以前是根据原发性细胞的类型[如人类单核埃里希体病（human monocytic ehrlichiosis，HME）]来命名的，但为了避免混淆，现在人们倾向于根据病原体（如查菲埃里希体病）来指定疾病类型。查菲埃里希体病是美国最常见的埃里希体病，也是美国南部第二常见的蜱传疾病，仅次于斑点热群立克次体病[34,38]。

埃里希体病几乎只通过被感染的蜱虫叮咬传播。查菲埃里希体病通过孤星蜱（*Amblyommaamericanum*）传播给人类，这是一种具有攻击性的硬体蜱虫，它会无选择性地叮咬包括人类在内的多种宿主[38]。这种蜱虫也会传播尤因埃里希体。美洲蜱是美国东南部最常见的蜱类之一，其分布范围延伸到新英格兰和上中西部地区。它的活动范围在许多地方与肩胛蜱重叠，因此，接触蜱虫的病人可能同时受到这两种蜱虫传播的病原体的威胁。与查菲埃里希体和*E. ewingii*相比，*eauclairensis*鼠埃里希体可能通过肩胛蜱传播给人类[53]。人类埃里希体病也可以通过器官移植和输血传播[54-56]，但并不常见。

1991年、1999年和2011年分别记录了查菲埃里希体、尤因埃里希体和*Eauclairensis*鼠埃里希体病的首次病例[53,57-58]。由于其与欧亚大陆发现的*Ehrlichiamuris*[59]存在遗传相似性，*Eauclairensis*鼠埃里希体最初被称为"*Ehrlichiamuris*样病原体"。虽然埃里希体病自1999年以来一直是美国的一种国家法定传染病，但直到2008年，才对病例的定义进行了细化，以区分查菲埃里希体，尤因埃里希体和嗜吞噬细胞无形体（以前归类为埃里希体种）的感染[34,60]。

根据美国疾控中心报告的数据，2008－2012年期间，共有4 613例查菲埃里希体感染和55例尤因埃里希体感染引起的埃里希体病，发病率分别为3.2和0.04，自2000年以来平均增加4倍。37个州和纽约市报告了查菲埃里希体病的病例，其中54%来自俄克拉荷马州、密苏里州、特拉华州、阿肯色州、弗吉尼亚州和田纳西州。发病率随年龄增长而增加，以65～69岁人群发病率最高，其中男性占57%。

仅12个州报告了尤因埃里希体病的病例，69%来自密苏里州、特拉华州和田纳西州[34]。发病率随年龄增长而增加，与其他人群相比，65岁及65岁以上的人发病率最高。男性占病例的51%。

与HGA相比，由于查菲埃里希体和*E. ewingi*引起的人埃里希体病没有双峰分布。大多数病例发生在5－8月之间，高峰发生在6月（查菲埃里希体病）和7月（尤因埃里希体病）[34]。

迄今为止，仅在明尼苏达州和威斯康辛州接触过蜱虫的患者[61]中检测到*Eauclairensis*鼠埃里希体，而在明尼苏达州和威斯康辛州以外采集的患者标本或肩胛蜱中未检测到*Eauclairensis*鼠埃里希体[53,61-62]。在2007－2013年的病例系列中，迄今仅报告了69例*eaucairensis*鼠埃里希体病（61例），但仍有其他病例不断被发现（未发表数据）。

美国国家埃里希体病报告的一个重要限制

因素是病例定义是主要基于血清学试验，由于抗原相似性，埃里希体物种之间表现出显著的交叉反应。此外，还观察到嗜吞噬细胞无形体高水平的血清学交叉反应。因此，血清学试验结果必须结合临床和流行病学特征来解释。例如，大多数来自上中西部地区的查菲埃里希体的感染报告很可能反映了 *Eauclairensis* 鼠埃里希体感染，因为肩胛蜱是人类疾病的主要蜱媒[34,63]。此外，*E. ewingii* 埃里希体病的病例必须是 PCR 阳性才能符合病例定义，仅用血清学方法检测的病例可能被错误地归类查菲埃里希体病。

与 HGA 一样，被动监测方法会显著低估人埃里希体病的真实发病率[64]。重度暴露组的前瞻性评估显示约 75%的血清转化者为亚临床表现，因此许多感染者可能不会接受评估埃里希体病的检查[65]。如果不进行适当的测试，也可能会错过诊断。在美国东南部和中南部的 7 个学术医疗中心，对 1999 年(1～17 岁)因各种原因抽取血液的儿童提交的残余血清进行了回顾性血清学流行率研究，检测出 13%[66]的儿童血清中有与查菲埃里希体(滴度 80 或更高)反应的抗体，阳性率为 2%(路易斯维尔，肯塔基州)～22%(温斯顿萨勒姆，北卡罗来纳州)。

白尾鹿(*odocioleus virginianus*)是查菲埃里希体和 *E. ewingii* 的主要宿主，本地犬也可作为寄生宿主[6,32,68]。其他携带感染了 *A. americanum* 蜱虫的鸟类和哺乳动物，也可以作为次要的寄生宿主[69]。本地犬除了作为寄生宿主的作用外，还能携带感染的美洲蜱接近人类家庭[70]。目前 *Eauclairensis* 鼠埃里希体的寄生宿主谱仍不清楚，但其中可能包括白足鼠[71-72]。2010 年狩猎季(9 月 14 日至 12 月 31 日)[72]，明尼苏达州里普利营地(Camp Ripley)被射杀的 181 只白尾鹿的简易血液采样中未检测到此种微生物。

3. 新立克次体病("森特苏热") *N. sennetsu* 以日本对腺热病的称呼命名，1953 年首次从 1 例疑似传染性单核细胞增多症的日本患者身上发现[73]，此后又有来自东南亚国家马来西亚、泰国和老挝[27,74]的患者的报道。新立克次体被认为是通过摄入未煮熟的鱼和水生昆虫中受感染的吸虫而传播给脊椎动物宿主的[25]。食用灰鲻鱼 *Mugil cephalus* 与人类新立克次体病有关，在攀缘鲈鱼 *Anabas testudineus* 中可检测到 *N. sennetsu* DNA 时，但在吸虫中尚未检测到该细菌[25,27,75]，这与在线虫宿主各生长阶段中发现 *Neorickettsiahelminthoeca*(犬科鲑鱼中毒疾病的病原体)和 *N. risticii*(波托马克马热病的病原体)有所不同。在俄勒冈州和乌拉圭的肝片吸虫[75]中发现了 1 株与 *N. sennetsu* 和 *N. risticii* 在基因组结构上高度嵌合的新立克次体(*Neorickettsia* spp.)。

该类病原体的人类感染病例较罕见，截至 2015 年，全世界报告的病例不足 100 例(76 例)。然而，据报道，老挝成年人和泰国发热患者中有较高比例(17%)和 0.2%～4.0%的人出现了 *N. sennetsu* 反应的抗体，表明这两种感染可能未被人们充分认识[27,74]。

4. 新埃里希体病 新埃里希体病是欧洲和亚洲新现的蜱虫传播人类感染病，是由"*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*"引起[77]。2010 年报告了第一例人类感染病例，距该微生物在荷兰蓖麻蜱中发现已有十多年了[6,77]。另外，在全沟硬蜱和其他蜱虫中也发现了"*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*"[77]。

四、临床意义

1. 人粒细胞无形体病(Human Granulocytic Anaplasmosis, HGA) 在被感染的蜱虫叮咬后的 5～11 天潜伏期内，HGA 通常表现为一种非特异性急性发热性疾病。整个临床表现可从亚临床或轻度症状性疾病到严重危及生命的疾病，并且疾病严重程度与患者年龄和(或)存在共病之间有直接的相关性[33]。患者最常见的症状是发热(高达 100%)、不适(97%)、头痛(82%)、肌肉痛(76%)和关节痛(56%)。胃肠道、呼吸系统、肌肉骨骼系统和中枢神经系统受累的患者不到一半。只有 6%的患者出现皮疹，而且在所有病例中，皮疹都可归因于伴偏头痛的莱姆病[36]。在 HGA 中脑膜脑炎很少被报道(0.9%的病例)[33]；然而，其他报道的神经后遗症包括面部双瘫、臂丛神经病变和脱髓鞘多发性神经病[78]最常见的实验室检查结果是血清转氨酶活性上升(83%)、血小板减少(75%)和白细胞减少(55%)伴淋巴细胞减少。非典型淋巴细胞增多症可发生在感染后第 1 周[79-80]。贫血不太常见，只有

28%[36]的报道。C反应蛋白水平的升高发生率为96%～100%，有助于区别于病毒感染[81-82]。脑脊液(cerebral spinal fluid,CSF)分析结果通常变化不显著，即使在有可疑CNS表现的患者中也是如此[83]。

2008－2012年间在美国发生的病例数据显示，在有资料的5937例病例中，1827例(31%)疾病较严重，需要住院治疗[33]。在2825例有资料的患者中，0.3%～3.0%有危及生命的并发症，如肾衰竭、急性呼吸窘迫综合征、脑膜炎或脑炎、肺炎、弥散性血管内凝血病和败血症等[33]。另有病例分析显示，7%的确诊患者(84例)出现危及生命的并发症。病死率的报道各不相同。来自中国某一地区的16例患者中，有一部分患者病情严重(包括胃肠道、肾和出血性表现、多器官功能障碍和更差的检验指标)，病死率为16；而中国山东省46例其他HGA患者病死率为2.6%，而在美国为0.3%[33,85]。有证据表明，由于蜱虫传播的尼亚病毒同时感染，中国的病例反映出更严重的情况[86]。在美国，70岁或以上[33]患者的病死率最高。

2. 查菲埃里希体病(*Ehrlichia chaffeensis* Ehrlichiosis) 与HGA一样，查菲埃里希体病的临床表现范围从亚临床感染到危及生命的疾病[84]。中位潜伏期为9天。患者最常见的症状是发热(97%)、不适(82%)、头痛(80%)、肌痛(57%)和恶心(64%)，但没有明确的体格表现[84]。其他胃肠道(呕吐和腹泻)、呼吸(咳嗽)和骨关节(关节疼痛)症状出现在不到50%的患者中[84]。与HGA相比，皮疹、黄斑和黄斑丘疹以不同的分布和发病率出现[87]；最常见于儿童(57%的病例)，也可发生在30%的成人[60,88]中。中枢神经系统受累也有报道，颈部僵硬和混乱分别出现在3%和19%的病例中[84,89]。查菲埃里希体病患者也可发展为噬血细胞性淋巴组织细胞增生综合征[90-91]。

至少86%的患者出现异常实验室参数，包括血清转氨酶水平升高(83%)、血小板减少(71%)和白细胞减少(62%)伴淋巴细胞减少和(或)中性粒细胞减少(84%)。

2008－2012年间在美国发生的病例显示，57%的查菲埃里希体病患者的病情严重到需要住院治疗，11%的患者出现危及生命的并发症，如肾衰竭、急性呼吸窘迫综合征、脑膜炎或脑炎、肺炎、弥散性血管内凝血病和败血症[33]。幸运的是，相应的病死率较低(1%)。其他报道描述9%～17%的患者[84]出现了严重并发症。暴发性感染在HIV、大剂量糖皮质激素、与器官移植相关的药物或特异性免疫抑制(如利妥昔单抗)和糖尿病[34,92-95]中更常见。在2008－2012年美国报道的病例中，有14%的病例出现免疫损害[34]。后一系列的病死率为0.7%～1.0%，其中儿童、5岁和70岁以上成人的病死率最高[34]。先前报道的死亡风险因素为男性、高龄、免疫抑制、诊断延迟和缺乏早期治疗[96-97]。

3. 尤因埃里希体病(*Ehrlichiaewingii* Ehrlichiosis) 尤因埃里希体病症状与查菲埃里希体病相似，包括发热、头痛、肌痛和不适[38]。血小板减少、白细胞减少和肝转氨酶水平升高是常见的实验室检查结果。在2008－2012年美国发生的52例有数据的病例中，40例(77%)患者的病情严重，34例需要住院治疗，没有死亡报道。38例患者获得了有关免疫状态的数据，其中10例(26%)有免疫损害情况[34]。这与早期报道的尤因埃里希体病不同，后者主要涉及免疫功能受损的患者。

4. 欧氏埃里希体(*Ehrlichia muris eauclairensis*) 从有限的可用数据来看，感染这种微生物的临床特征似乎与其他埃里希菌相似，发热、不适、头痛和肌痛是主要的报道症状(分别见于89%、76%、67%和60%的患者)[61]。最常见的实验室观察值是肝转氨酶升高(78%)、血小板减少(67%)、淋巴细胞减少(53%)、白细胞减少(39%)和贫血(36%)。目前为止未见死亡报告。

5. 新立克体(*Neorickettsia sennetsu*) 新立克体病患者会出现一种自限性的发热性疾病，包括畏寒、头痛、全身乏力、喉咙痛、厌食和全身淋巴结肿大[76]。实验室检查的结果包括早期恢复期早期白细胞减少症和外周血中的非典型淋巴细胞。没有死亡或严重并发症的报道[76]。

6. 米库伦新埃里希体(*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis) 迄今为止，只有26例新埃里希体病报告[77]。其中12例免疫功能低下患者有高热(12/12)、肌痛/关节痛(8/12)、血管/血栓栓塞事件(6/12)、体重减轻(5/12)和皮疹(4/12)[77]。血管事件包括深静脉血栓、肺栓塞、短暂性缺血发作和下肢水肿[77]。另外14例免疫功能正常的患

者临床表现更为多变，包括5例波兰患者的无症状感染及1例德国致命病例。至今免疫功能正常患者中最大的病例系列来自中国，其中报道了发热(7/7)、肌痛/关节痛(4/7)和皮疹(1/7)等临床症状[77]。与严重疾病相关的宿主因素包括高龄和免疫损害，包括脾切除术[77]。

7. 沃尔巴克体与人类疾病的关系 尽管在1例患有非霍奇金淋巴瘤[98]的发热患者中报道了仅与昆虫相关的沃尔巴克体引起的血流感染，但尚未证实沃尔巴克体对人类或动物具有直接致病性。然而，有证据表明，丝虫、蠕虫如马来丝虫、盘尾丝虫和班克罗夫提丝虫可在人类宿主体内释放细胞内 *Wolbachia* 的菌体成分。理论上，这些微生物成分是炎症的增强剂，可能引起与丝虫感染相关的淋巴阻塞[99]，表明菌体和丝虫存在共生关系，蠕虫依靠它们在各个阶段之间生存。

五、收集、运输和标本的存储

诊断无形小体科(*Anaplasmataceae*)感染最常用的方法是血清学、适用时的外周血膜显微镜检查(是否存在桑椹体)和核酸扩增[38]。本部分将集中用于检测嗜吞噬细胞无形体和查菲埃里希体的标本收集。

对于无形体病和埃里希体病的血清学确认，建议至少检测两份血清样本：一份在急性疾病期间获得，另一份在2～4周后的恢复期获得[38]。检测单一血清样本(急性期或恢复期)几乎没有用处，不能用于确认感染。标本应在特定的运输装置(如促凝管)中收集，并在室温下运输到实验室。理想的运送时限为2 h之内[100]，但现实中基本做不到。

EDTA抗凝血是核酸扩增试验(NAAT)、涂片和培养中最常用的样本，应在抗生素治疗开始前的疾病活跃期[38,101-102]获得。急性期外周血浅黄色涂片或CSF细胞的细胞离心制剂可用于增加载玻片上检查的白细胞数量；由于白细胞会迅速退化，应在获得样品后数小时内制备这些标本[38]。制备好风干的血液涂片和细胞离心的脑脊液涂片在室温下可稳定数月或数年。

全血是NAAT法确认无形体病和埃里希体病的首选样本，因为它含有受感染的白细胞。不应使用血清或血浆。应立即测试NAATs样品，或将其冷冻在－80～－20 ℃以备将来测试[38,100]。全血也是培养埃里希体和无形体[38,102]的首选样本。样品应通过无菌静脉穿刺或腰椎穿刺获得并尽快处理。运送期间，样品应保持在4 ℃，不得冷冻。嗜吞噬细胞无形体比查菲埃里希体更容易培养，并且可以从保存在4℃下长达18天的EDTA抗凝血液中培养获得[103]。分离后，埃里希体属(*Ehrlichia* spp.)和嗜吞噬细胞无形体可以在－80℃下被感染的宿主细胞内冷冻数月，并在液氮中保存更长时间以保持生存能力。当超过50%～90%的宿主细胞被感染时，最好的储存感染细胞，可在含有5%～10%的二甲基亚砜和10%～45%胎牛血清的细胞培养基中储存细胞浓度为10^6个/L的悬液进行保存[104-105]。

六、实验室检测确认

如前所述，本节将着重于HGA和查菲埃里希体病的实验室检测确认。这些感染的检测可能无法在当地的临床实验室进行，特别是在该类感染不属地方病的情况下，但通常可在指定的商业或公共卫生实验室[38,100]进行。需要注意的是，感染可能会迅速致死，在最初的患者治疗时，确认的实验室结果很少能在治疗前获得。因此，相关治疗通常需要在收到测试结果之前就要开始[38,97]。

用于实验室确认HGA和查菲埃里希体病的方法在其性能特征、实用性和时效性等方面存在显著差异[38]。血清学诊断、分子扩增和血涂片检查是最常用的方法。培养法很少用于临床实验室，但可由专业参考或公共卫生实验室提供[100]。嗜吞噬细胞无形体和查菲埃里希体的推荐诊断试验如表67-2* 所示。注意，每种方法的敏感性在感染过程中随时间而变化，在感染的早期和晚期[38,106]可能首选不同的试验。一般来说，NAAT和血涂片检查在发病的第1周有最高的敏感性，而血清学检查在恢复期有最高的敏感性[8,38,106]。

*译者注：原著引用其他著作表格，未经原作者授权翻译，故此保留原表格

表 67-2　Comparison of diagnostic modalities for infection with *E. chaffeensis* and *A. phagocytophilum*, by time interval after onset of clinical illness[a]

Weeks after onset, diagnostic test	Sensitivity, %	
	E. chaffeensis ehrlichio	HGA
≤1		
Blood smear evaluation	2-38	25-75
PCR	60-85	67-90
Culture	Highly variable[b]	≥55[c]
Serologic testing	22-55	24-44
1-2		
Blood smear evaluation	Unknown	63
PCR	Unknown	68
Culture	Unknown	33
Serologic testing	68	91
≥3		
Serologic testing	≥90	≥95

[a]Modified with permission from reference 84

[b]May require weeks of incubation.

[c]May require weeks of incubation; results are often positive within 2 weeks.

嗜吞噬细胞无形体和查菲埃里希体的检测应在使用生物安全 2 级规程的设施中进行，原始临床标本的操作应在生物安全柜中进行[107]。

(一)直接检查

1. 外周血染色罗曼诺夫斯基显微镜　检查吉姆萨或赖特染色的外周血或分层白细胞是否存在粒细胞内特征性细胞的特征性桑椹体是诊断 HGA[38,84]的一项非常有价值的方法，尽管结果可能不一致，报道的敏感性为 25%～75%[106,108]。这是一种敏感性较低的查菲埃里希体病检测方法，敏感性为 2%～38%[108-109]。对于这两种病原体，桑椹体的准确检测高度依赖于操作人员。但操作应由熟练且经验丰富的显微镜师进行[38]。尽管对 HGA 的研究显示，仅有 200 个中性粒细胞已足以检测出涂片阳性患者[111]，但通常仍建议在 500～1000 倍的放大镜下检查 800～1000 个细胞是否存在桑椹体[110]。由于大多数呈阳性涂片的患者有 1%的受感染的粒细胞，并且通常有白细胞减少症，所以分层白细胞涂片比外周血涂片有更好的效果。查菲埃里希体最常见于免疫功能低下的病例。外周血中可检测到的受感染白细胞的数量与感染的严重程度相关不大[79,112-113]；已报道受查菲埃里希体感染的细胞百分比仅为 0.2%～10.0%，嗜吞噬细胞无形体则可达到 40%或更高[112]。桑椹体比较小(直径 1～3 mm)，圆形到椭圆形的黏性小细菌簇，罗曼诺夫斯基染色为嗜碱性到嗜两性(图 67-2)。这些团簇存在于 HGA 或单核细胞(查菲埃里希体病)的细胞质中，由于液泡内的单个细菌而呈现点状外观。各种结构如白细胞毒性颗粒、吞噬细菌和酵母菌、*Döhle* 体、核碎片、*auer* 小体和覆盖在细胞上面的血小板可以具有相似的外观，必须注意和桑椹体区别[38]。

2. 抗原检测的免疫化学　免疫化学方法也可用于在细胞学标本(如细胞离心的脑脊液)或福尔马林固定的石蜡包埋的人体组织(包括骨髓、肝和脾)中鉴定嗜吞噬细胞无形体和查菲埃里希体，尤其可用于确认尸检标本中的诊断[108,114-115]。用骨髓检查检测活动性查菲埃里希体感染的敏感性仅为 40%[108]，而嗜吞噬细胞无形体检测的敏感性和特异性尚未确定。已报道一种单克隆抗体可以特异性地检测人类组织中的查菲埃里希体[116]，但大多数研究使用的多克隆抗体可与其他埃里希体物种发生反应，目前还无法对这两种病原体进行商业化的检测分析。

3. 核酸检测试验　全血标本 DNA 的扩增和检测为实验室确诊急性 HGA 和查菲埃里希体病提供了一种高准确度的方法，其敏感性相当于甚至超过培养和血涂片分析[38,84]。PCR 是这些检测中最常用的扩增方式。

(1)吞噬细胞无浆体：现已报道了多种检测嗜吞噬细胞无形体核酸的 PCR 方法，包括常规法和实时法[53,117-120]。在发病后的 14 天内，PCR 至少与血涂片检测一样敏感，在发病后的较长时间内(14～30 天)，PCR 法则更为敏感[106]。许多方案利用了 *rrs*(16SrRNA 基因)的扩增。一种经常使用和评估的常规方法是使用引物 ge9f 和 ge10r 来扩增 919bp 片段，通常在单阶段反应中使用或不使用杂交探针来提高敏感性[10,118]。以前流行的一种方法是用巢式 PCR 和一组外部引物扩增 16SrRNA 基因，然后用内部巢式嗜吞噬细胞无形体特异性引物[89,119]进行 PCR。(在实时 PCR 发展之前进行的研究中，用从嗜吞噬细胞无形体感染的 HL-60 细胞[119]的连续稀释液中提取的 DNA 评估了几种已发表的引物集的分析敏感性和特异

性。)用从查菲埃里希体，*Rickettsia rickettsii* 和 *Bartonella henselae*. 的培养物中提取的 DNA 评估特异性。敏感性和特异性最高的引物组是那些用于巢式 PCR 扩增 rrs、ge3a-ge10 和 ge9-ge2 的引物组，以及那些扩增 *msp*2 基因、*msp*2-3*f*-*msp*2-3*r*[119]的引物组。两种 PCR 方法检测到的 HL-60 细胞感染率均为 0.25。实时 PCR 检测可达到每微升血液中只有 1 个受感染细胞的敏感性。一个已报道的多重实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RRS)检测了 3 个埃里希体和 2 个 spp. 无形体，并且分析敏感性为 100 个 RRS 转录体(在测试样本中大约有 1 个被感染的细胞)[117]。另一个研究报道了具有类似分析敏感性的多重实时检测方法，其靶标是 *Anaplasmataceae gro EL* 并使用杂交探针和熔融温度分析检测和区分查菲埃里希体，尤因埃里希体和嗜吞噬细胞无形体[106,121]。虽然目前美国 FDA 还没有批准相关体外诊断试验，但一些带有 CE 标记的试剂盒可用，包括 Liferiver 和 Bioron Diagnostics 的试剂盒，以及 InterLabService 的试剂盒用于检测 *B. burgdorferi*，*A. phagocytophilum*，*E. chaffeensis* 和 *E. muris* 的多重病原体试剂盒(AmpliSens)，仅限研究用途(research use only，RUO)的试剂盒也有出售。

(2)查菲埃里希体：有许多潜在的基因靶点可用于查菲埃里希体感染的分子检测，其 PCR 敏感性为 60%～100%[70,89,101]。最广泛使用的方法是用 HE1/HE3 引物组[89,122-123]对临床标本中的查菲埃里希体 DNA 进行 PCR 扩增。这对引物扩增了 389 bp 的 *rrs* 片段。在琼脂糖凝胶电泳后，通过简单核酸染色(如溴化乙锭)，用内部探针对扩增产物进行 Southern 杂交，或者最好通过实时 PCR[124]来检测产物。用 HE1/HE3 系统对查菲埃里希体 PCR 的临床评估显示，与血清学相比，其敏感性 79%～100%；然而，查菲埃里希体的核酸经常在从未产生抗体的患者中检测到[89,123]。用宽范围 *rrs* 引物(8F 和 1448R)进行巢式 PCR 分析，然后用引物 15F 和 208R 对全血进行第二次(巢式)反应，得到与培养[89]相似的结果。尚未对临床敏感性或特异性进行全面评估的 PCR 的其他靶点包括查菲埃里希体[89,93,120]中存在的外表面可变长度 PCR 靶蛋白基因、编码免疫显性抗原的 *TRP*120 基因及在查菲埃里希体菌分离株之间变化的标准重复亚单位，喹啉酸合成酶 A 基因(nadA)、二硫键形成蛋白基因(dsb)和 p28 多基因家族[93,120,125-126]。在一项前瞻性研究中，以 16S rRNA 亚基、*nadA* 和 *TRP*120 基因和血清转化为"金标准"比较方法，PCR 的总敏感性和特异性分别为 84%和 100%。

已开发了实时 PCR 检测技术，与巢式 PCR[117,125]相比，它具有极高的分析敏感性和特异性。与传统 PCR 相比，实时 PCR 的优点包括提高了特异性(降低了污染风险)、提高了结果速度、降低了成本及具有同时检测多个 *Anaplasmataceae* 病原体的能力。广泛的实时 PCR 检测方法以查菲埃里希体、嗜吞噬细胞无形体和尤因埃里希体为靶点，显示出良好的临床敏感性和特异性，同时也可检测 *Eauclairensis* 鼠埃里希体[53,121]。虽然目前没有 FDA 批准的检测产品，但有 CE 标记的试剂盒，包括 Bioron Diagnostics 和 InterLabService(检测 *B. burgdorferi*、*A. Phytophilum*、查菲埃里希体和鼠埃里希体的多重病原体试剂盒)。

(二)分离程序

如上所述，培养法在临床微生物学实验室中很少使用。嗜吞噬细胞无形体和 *Ehrlichia* spp. 都是 2 级生物安全病原体。相对于查菲埃里希体、*E. canis*、*Eauclairensis* 鼠埃里希体，或者 *N. sennetsu* 而言，嗜吞噬细胞无形体从人类患者中成功培养的例子更常见，这可能是由于被感染患者外周血中存在数量较大[110]所致。由于嗜吞噬细胞无形体和埃里希体是细菌，因此，必须避免在培养基中使用抗生素。嗜吞噬细胞无形体和 spp 埃里希体的分离方法可在本手册以前的版本和一些优秀的论文[102,104-105]中找到。

(三)血清学检查

血清诊断 HGA 和查菲埃里希体病的金标准方法是用间接免疫荧光法(immunofluorescence assay，IFA)检测双份(急性期和恢复期)血清，证明 IgG 滴度或血清转化率增加了 4 倍。IFA 使用含有嗜吞噬细胞无形体或查菲埃里希体抗原的载玻片，然后将其暴露于患者血清中。如果存在，用荧光标记的二级抗体检测血清样本中的特异性抗体。如果在玻片上用荧光显微镜观察到典型的胞

浆内桑椹体，则试验为阳性。该试验重要的是确定由阳性对照血清确定的感染细胞的适当比例，以及每个抗原制剂的适当形态，以防止假阳性解释。对免疫荧光模式的解释是比较主观的，需要有经验的显微镜操作技师。与多数血清学试验一样，在感染的第1周，敏感性很低(表67-2)，这却是大多数患者进行医学评估的时候[38]。敏感性随着时间的推移而增加，大多数测试在症状出现后2～3周内高度敏感。

尽管针对感染细菌的抗体效价通常较高，但在针对*Ehrlichia*物种的抗体之间，以及嗜吞噬细胞无形体和查菲埃里希体的抗体之间存在明显的交叉血清反应性。因此，当怀疑存在HGA或查菲埃里希体病时，建议对两种细菌的抗体进行筛选。抗体在感染消退后可以持续数月至数年，并且可能在居住于流行地区的健康个体中占很高比例[38]。

1. 吞噬细胞无形体 检测人血清的首选方法是使用在HL-60早幼粒细胞系[102,127-131]中传代的人分离物的抗原。IFA血清诊断试剂盒的商业来源包括Focus Diagnostics和Fuller Laboratories。虽然酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫印迹法[8,127,130]已有报道，但它们并不常规用于HGA的血清诊断。此外，在能够快速检测的设备中使用免疫印迹确认法或商业化制备的重组嗜吞噬细胞无形体msp2蛋白或肽的技术已被用于动物实验室的血清学诊断，但尚未用于人类感染的诊断[132-133]。大多数测试检测IgG类抗体。IgM检测对鉴别近期感染有潜在的帮助，但其敏感性和特异性都不如检测配对血清中IgG的敏感性和特异性高，并且关于IgM特异性的问题导致CDC不鼓励将其作为单一检测使用[134]；因此，IgM检测不常用或不推荐使用[131]。

血清应在单一稀释度(1∶64或1∶80)下进行筛选，并在用荧光标记的抗人IgG孵育后测定IgG抗体的存在。如果样本有反应性，则应连续稀释以测定终点滴度。当恢复期的抗体滴度上升4倍时，最低IgG滴度为1∶128，即可获得血清诊断确认。在具有典型HGA临床特征的患者中显示单一高IgG抗体滴度(1∶128)也可用于支持HGA的诊断[113,135]。25%～45%的感染患者在呈递时具有抗体[113,129,135-136]；然而，在HGA流行的地区多达11%～14%的人口拥有抗体，使得单一血清学试验的效价降低[43-44]。急性感染期间的典型反应是抗体水平快速升高(在发病后2周内)，在第一个月内[129,136]达到高滴度(1∶640)。在经培养确诊的患者中，抗体滴度逐渐降低几个月后，约半数患者在感染1年后可通过IFA检测到抗体。然而，许多患者在初次感染后数月至数年内都可检测到抗体[136]。由于典型的临床病例与嗜吞噬细胞无形体群抗原[113,129,136]的血清学反应之间存在良好的相关性，因此认为HGA血清学试验的敏感性和特异性都很高。23例患者中有21例(91.3%)经培养证实为HGA，从中可获得恢复期样本[129]。在实验室间和实验室内的评估中，配对血清学对28例经培养、PCR或血液涂片中有桑椹体诊断的患者的急性HGA检测的中位敏感性为95%[131]。值得注意的是，在15%的病例中，HGA患者对查菲埃里希体有血清学反应，但往往表现出较高的嗜吞噬细胞无形体抗原滴度[113,131]。

在感染其他立克次体、Q热病原体和EB病毒的患者中可观察到假阳性反应。许多HGA患者通过ELISA产生与*B. burgdorferi*反应的抗体，并显示诊断性*B. burgdorferi* IgG或IgM免疫印迹[137]。其中大多数可能代表了对*B. burgdorferi*的假阳性，尽管一些患者经培养证实与*A. phagesytophilum*和*B. burgdorferi*同时感染[138-139]。另一种解释是先前接触另一种蜱媒(连续蜱虫叮咬)。确实，针对多种病原体的抗体在生活在高流行地区的人群中很常见[43,140]。对血小板和其他白细胞成分的自身抗体也会引起假阳性IFA检测[141]。预先筛选自身抗体或常规去除类风湿因子将减少由于抗体与细胞成分(包括可能具有桑椹体形态外观的细胞核或细胞质抗原)反应而引起误解的风险。嗜吞噬细胞无形体的分离株之间存在抗原多样性，但一般认为这不影响临床标本的检测[131,142]。

2. 查菲埃里希体 与查菲埃里希体抗原反应的抗体最常用于感染DH82犬巨噬细胞样细胞的阿肯色州查菲埃里希体株的IFA检测。以前用血清学上存在交叉反应的*E. canis*作为替代抗原；然而*E. chaffeensi* IFA抗原目前是现成可用的，可用于大多数测试[143]。Ehrlichial抗原可能很难制备。幸运的是，IFA血清诊断试剂盒有几种商业来源，包括Focus Technologies、Fuller Laboratories和Scimedx Corporation提供的试剂盒。免

疫印迹法在查菲埃里希体病诊断中的作用尚不明确，不提倡使用。基于重组蛋白和合成肽的替代方法显示出一些前景，但这些方法还没有商业化[144-146]。与HGA一样，大多数测试检测IgG类抗体。尚未对IgM检测的有效性进行系统评估，但基于9例经培养证实的病例的初步评估表明，它可能比IgG在急性期诊断查菲埃里希体病的敏感性稍高[147]。然而，由于对特异性的考虑，目前不推荐对查菲埃里希体病[134]进行IgM检测。

目前，埃里希体属血清学试验没有标准化方法，而终点滴度在一定程度上取决于执行这些分析的各个实验室的验证或是按照制造商的说明。IFA血清学试验的算法包括1∶64或1∶80稀释度的初筛，用于检测抗查菲埃里希体IgG抗体。然后将有反应性的样品滴定至终点。与IFA检测HGA一样，如果出现典型的胞质内桑椹体荧光，则检测为阳性。IgG抗体滴度增加4倍证实了查菲埃里希体病的诊断。一个高特异性IgG滴度1∶128的结果，正如显微镜下鉴定单核细胞或巨噬细胞中的桑椹体一样，可为临床表现一致急性感染的患者提供支持性证据。急性期血清应在出现急性疾病时获得，恢复期血清最好在3～6周后获得。

目前，尚不清楚IFA诊断查菲埃里希体感染的敏感性和特异性，但据文献记载，查菲埃里希体的新抗体或抗体滴度上升与临床特征性发现之间存在相关性，故认为IFA诊断查菲埃里希体感染的敏感性和特异性较高[65]。在感染早期，与PCR相比，IFA检测并不敏感(表67-2)[147]。在被诊断为落基山斑点热、Q热、布鲁菌病、莱姆病和EB病毒感染的患者[138,143]中检测到假阳性反应。自身抗体的存在也会导致假阳性结果。

查菲埃里希体分离株之间的抗原多样性已得到详细的报道[148]，但它并不会影响对人类感染产生的多克隆抗体反应的检测。一些报道描述了疑似查菲埃里希体病的患者，即使在症状出现后很久后仍缺乏抗体反应[89,123,149]。然而，在少数病例经培养法证实为*E. chaffeensi*感染，存活患者经IFA检测出现明显的恢复期血清学反应[58,89,93,148,150]。假阴性结果的假设性原因包括抗原多样性菌株的感染(未经证实)和通过早期治疗消除抗体反应[89]。

七、抗菌药物敏感性、治疗和预防

强力霉素是治疗儿童和成人立克次体感染的首选药物[38]。尚未进行前瞻性对照治疗试验，以确定对*Ehrlichioses*和*Enaplasmosis*的抗菌效果。然而，回顾性研究和常规临床实践的观察表明，查菲埃里希体病和HGA患者通常在强力霉素[36,65]治疗后48 h内缓解。四环素类药物对*Ehrlichia*和*Anaplasma*物种的杀菌作用是一致的，而氯霉素的MIC在查菲埃里希体病或HGA患者中不能安全地实现[151-155]。值得注意的是，许多治疗发热的抗菌药物，如青霉素、头孢菌素、氨基糖苷类和大环内酯类，在体外并不抑制埃里希体的生长。利福霉素(利福平和利福布丁)能在体外有效地抑制或杀死埃里希体和无形体，氟喹诺酮类药物(氧氟沙星和左氧氟沙星)对嗜吞噬细胞无形体[153,155]的MIC很低。然而，至少有一个报道记录了左氧氟沙星停药后嗜吞噬细胞无形体感染的复发，以及随后对强力霉素的临床反应[156-158]。利福平已经成功地用于不能接受四环素类药物的患者，或者作为包括孕妇和儿童患者在内的首选替代药物[156,158]。用实时PCR法进行体外药敏试验，结果表明，查菲埃里希体对强力霉素和利福平敏感，对氟喹诺酮类药物部分敏感。已证实对大环内酯类、复方新诺明和β-内酰胺类化合物的耐药性[151]。

尽管埃里希体和无形体的持续感染即使在四环素治疗后也可能在自然和实验感染的动物中发生，但这些细菌在人类中的持续感染很少被证实，且一般认为不具有临床意义[149,159-160]。抗菌治疗可非常有效的从受感染的人的血液中去除相关病原体。

预防人无形体病和埃里希体病是避免蜱虫叮咬和迅速清除附着的蜱虫[38]。动物研究表明，蜱类在嗜吞噬细胞无形体传播前24～48 h附着在宿主身上，因此尽快清除蜱类可降低传播风险[38]；然而，至少有一项研究表明，蜱类可在叮咬后4 h内传播疾病[161]。查菲埃里希体或*E. Ewingi*传播没有类似的数据。已经报道了预防蜱虫叮咬的多种措施，包括使用驱虫剂(如DEET)、环境改造和使用防护服[38]。宠物和家畜也可采取各种体外寄生虫控制措施，包括局部使用杀螨剂[38]。

八、结果的评价、解释和报告

鉴定埃里希体和无形体物种的感染需要进行临床识别，然后进行实验室确认[38]。由于很少能进行快速的特异性诊断，因此，在怀疑诊断时应开始用强力霉素进行经验性治疗，因为延误可能导致发病率增加，甚至可能导致死亡率增加[38,97]。理想情况下，应在开始治疗之前收集诊断性样品，并应鼓励患者在 2～6 周后返回临床进行血清学随访以收集恢复期的血清样品。

外周血白细胞内存在细胞质内包涵体有助于诊断，但缺乏敏感性和特异性[38,84]。如果观察到埃里希体或无形体桑椹体的典型形态，应分析细胞类型和含有桑椹体的细胞百分比。阳性 PCR 结果的报告表明存在查菲埃里希体或嗜吞噬细胞无形体 DNA。使用长范围 PCR 鉴定血液中埃里希体或无形体 DNA 的实验室也可以检测出类似 HGA 或查菲埃里希体病的 *E. ewingii* 和 *Eauclairensis* 鼠埃里希体病感染[53,57]。以 *rrs*（16S rRNA 基因）或 *groEL* 为靶点的宽范围 PCR 检测也发现了欧洲的“*Candidatus* Neoehrlichia mikurensis”感染[162]。FA 血清学结果报告为被确定为与查菲埃里希体或嗜吞噬细胞无形体有反应的抗体的滴度，包括实验室使用的阳性阈值。用血清学方法诊断查菲埃里希体或嗜吞噬细胞无形体感染的金标准是 IgG 滴度增加 4 倍或血清转化度增加 4 倍。解释应表明效价是否被视为“显著”或“阳性”，最好是基于效价增加 4 倍或减少 4 倍。当仅获得一个高血清 IgG 滴度时，实验室应注意它仅是支持性证据，而不是确认的感染证据。不提倡单独使用 IgM 滴度来确定诊断，因为它不如单独使用 IgG 敏感。值得注意的是，感染以尤因埃里希体和 *Eauclairensis* 鼠埃里希体产生的血清学模式被诊断为查菲埃里希体，也可能是诊断为嗜吞噬细胞无形体[38]。

埃里希体病和无形体病的病例应与疾病预防控制中心的蜱传立克次体病病例报告表（http://www.CDC.gov/Tick s/forms/2010_tbrd_crf.pdf）一起报告。为了进行监测，州和地区流行病学家委员会和疾控中心制定了一个病例标准，并在 2008 年进行了修订，将查菲埃里希体病（HME）、HGA、*E. Ewingi* 感染和未确诊 *Ehrlichiosis/Anaplasmosis* 包括在内（http://www.cdc.gov/NNDSS/script/casedef.aspx?CondYrID=667&DatePub=1/1/2008%2012:00:00%20AM）[134]。根据这一定义，临床相关病例是指患者出现任何报告的发热和以下一种或多种情况：头痛、肌痛、贫血、白细胞减少、血小板减少或任何肝转氨酶升高。要确定一个临床相关的病例，需要：①通过 IFA 检测成对血清样本中的查菲埃里希体的 IgG 抗体或嗜吞噬细胞无形体抗原滴度[128]发生 4 倍的变化；②阳性 PCR 和查菲埃里希体或嗜吞噬细胞无形体 DNA 的确认；③查菲埃里希体或嗜吞噬细胞无形体 DNA 抗原的免疫染色活组织检查或尸检样本；④从临床样本中培养查菲埃里希体或嗜吞噬细胞无形体 DNA。一个临床相容的病例，具有：①单个 IFA 查菲埃里希体或嗜吞噬细胞无形体 IgG 滴度 1∶64；②单核细胞（HME）或中性粒细胞（HGA）中桑椹体的鉴定被认为为可能的 *Ehrlichiosis/Anaplasmosis*。CDC 不使用 IgM 检测结果作为独立的诊断支持标准。由于没有特异性抗原和血清学方法，只能通过核酸扩增方法来诊断 *E. ewingii*，鼠埃里希体样病原体和“*CandidatusNeoehrlichia mikurensis*”感染。当血清学试验不能区分被查菲埃里希体或嗜吞噬细胞无形体感染时，使用“未确定”的埃里希体病或无形体病。

最后，临床医生应该考虑蜱传播共感染的可能性，特别是那些对嗜吞噬细胞无形体和埃里希体类抗生素治疗无效的患者。尤其微小巴贝虫和波瓦桑病毒可能由肩胛蜱传播，这是传播嗜吞噬细胞无形体的同一蜱类，两者均对多西环素无反应。

最后，感谢 Megan E. Reller 对本章的贡献。

参考文献请扫二维码查阅

第68章　柯克斯体属*△

GILBERT J. KERSH, CHANTAL P. BLEEKER-ROVERS

（徐元宏　译；韩立忠、孙自镛、穆红　审校）

一、分类学

贝纳柯克斯体（*Coxiella burnetii*）为革兰阴性小杆状，寄生在宿主真核细胞细胞质的纳虫泡（parasitophorous vacuole）内（无脊椎动物或者脊椎动物）。贝纳柯克斯体是γ变形菌纲（*Gammaproteobacteria*）成员。与它亲缘性最近的细菌是军团菌属。《Bergey 系统微生物学手册》（*Bergey's Manual of Systematic Microbiology*）将其归类于军团菌目（*Legionellales*）柯克斯体科（*Coxiellaceae*）[1]。柯克斯体属（*Coxiella*）可能包含其他的种。螯虾柯克斯体（*C. cheraxi*）是澳大利亚淡水红螯虾（*Cherax quadricarinatus*）的一种致病菌。在扁虱（*Ticks*）和焦痂患者皮肤活检中发现有 *Candidatus* Coxiella massiliensis 菌[2-3]。有关扁虱的研究发现，与贝纳柯克斯体相关的一组不同的微生物很可能是母系遗传虱类共生体的一个古老谱系[4]。对这些柯克斯体样微生物的深入研究可能会扩大柯克斯体属的种群数量。

二、病原体描述

贝纳柯克斯体（*C. burnetii*）于1935年首次分离，由于其在细胞内复制、体积小、存在于蜱和染色的特性而被称为立克次体（rickettsia）。现在已知它在遗传上不同于立克次体，并具有许多独特的特征。复制贝纳柯克斯体以一种称为大细胞变体的形态存在。在生活史的不同阶段，贝纳柯克斯体有不同的形态。大细胞变体（large-cell variants, LCV）[(0.4～1.5) μm×(0.2～0.5) μm]代谢活跃，在宿主真核细胞纳虫空泡内以二分裂方式繁殖，见图68-1。小细胞变体（small-cell variants, SCV）(0.5 μm×0.2 μm)为条件不适宜活跃生长时形成的高电子密度形式。SCV是可滤过的(0.22 μm)，与LCV相比，这些非活跃形式细胞差异表达特定的蛋白质。SCV尽管不被认为是孢子，但在细胞外或环境中作为细菌生存和可传染/传播的形态。SCV具有耐热、抗干燥和某些消毒剂的能力，但对它们的耐受程度不如典型的细菌孢子[5]。细菌的细胞壁着色不佳，Gimenez染色法更佳。

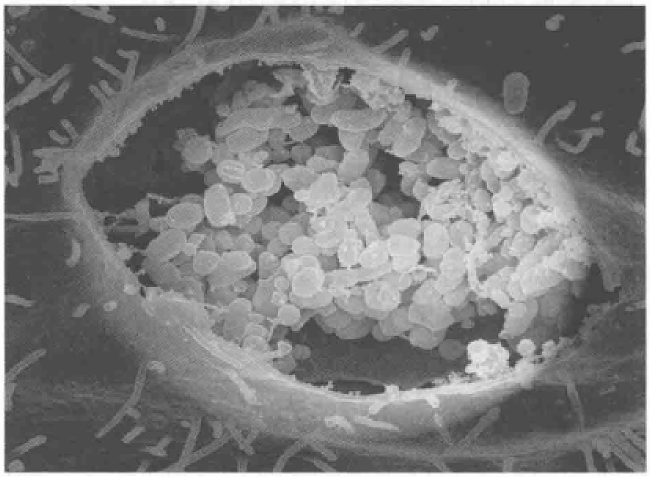


图68-1　冷冻处理的Vero细胞PV内贝纳柯克斯体扫描电镜显微照片，该细胞被Ⅱ相贝纳柯克斯体菌株Nine Mile感染（图片来自公共卫生图片库，由美国过敏和传染病研究所提供），见彩插

---

*本章包含 Stephen R. Graves 和 Robert F. Massung 在本手册第11版第66章中呈现的部分内容

△柯克斯体属（*Coxiella*）

Nine Mile 及贝纳柯克斯体其他菌株的全基因组序列显示其具有环形基因组，大约 200 万个碱基对，包括许多插入序列，多数菌株具有一个单质粒[6-7]。许多假基因的存在意味着进行中的基因退化过程，可能与近期进化适应细胞内生活方式有关。与立克次体科（Rickettsiaceae）不同，贝纳柯克斯体不需要跨细胞膜运输 ATP，几乎具有全部的生物合成能力。它的生长需要低细胞外 pH（<5.25），并利用Ⅳ型分泌系统将效应蛋白转运至宿主细胞[8]。细胞外相代谢活跃，可在低 pH 下利用糖和谷氨酸，并能转变为 LCV，置于专用培养基[酸化柠檬酸半胱氨酸培养基（ACCM）]和低氧环境下还可复制[9-10]。

早在 1956 年就发现，贝纳柯克斯体存在 2 种抗原相[11]。从感染动物或人体分离的贝纳柯克斯体类型称为Ⅰ相，这种抗原型具有毒性。当这些分离株在实验室内组织或鸡胚中培养而持续生长一段时期，可逐渐转化成无致病力的第二种形式（Ⅱ相）。在抗原学上，各相之间最显著的差异是Ⅱ相贝纳柯克斯体的脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）缺少全长的 O 抗原多糖侧链。两相间的转变可能涉及遗传物质的丢失，从而使微生物无法合成全长多糖。然而，某些菌株丧失毒力似乎并不涉及基因的改变[12]。体外从毒性Ⅰ相到无毒性Ⅱ相转变类似于肠杆菌科细菌从光滑型到粗糙型转变[13]。LPS 蛋白截短与毒力丧失之间的相关性暗示，Ⅰ相 LPS 可能是贝纳柯克斯体关键的毒力决定因子。

三、流行病学及传播

人类通过吸入动物散播的病原体从而感染贝纳柯克斯体。贝纳柯克斯体与脊椎动物尤其是牛、绵羊、山羊相关联，它们可以在其胎盘大量复制繁殖到很高的浓度。动物分娩时，胎盘、胎儿及与之相关的黏膜与体液中高浓度的贝纳柯克斯体容易污染周边环境[14]。少量贝纳柯克斯体可从尿、粪便和牛奶中排出。一旦排出，细菌可以在土壤和干草等中以“孢子样”SCV 形式存活很多年（甚至几十年）[15-16]。SCV 可随空气传播数公里，被宿主吸入[17-18]。其他潜在的传播方式包括食入、经皮接种和性传播。感染的奶牛和其他哺乳动物产的乳汁中可能含有贝纳柯克斯体[19]，这些细菌在巴氏消毒过程中，当温度足够时会被杀灭[20]。

许多其他脊椎动物可以作为贝纳柯克斯体的宿主，包括鸟类、海洋哺乳动物、袋鼠、猫和狗等[21]。尽管北美出现人群间的暴发与猫和狗的分娩有关[22-23]，但大多数 Q 热病例与牲畜有关。许多种蜱或贮藏或传播贝纳柯克斯体，并在家畜感染中起重要作用。但蜱并不是其感染人类的主要途径。尽管有报道蜱叮咬可能感染人类，但大部分人类感染都是通过感染动物密集区的气溶胶传播的，例如分娩山羊的畜群。感染的动物通常无症状，但在受感染的怀孕的绵羊和山羊中已观察到流产和死产[14,24]。

Q 热在全球都有发现，目前除新西兰以外，各国均有流行。血清流行率研究发现在许多国家，贝纳柯克斯体的暴露/接触率都很高。与牲畜经常接触人群的暴露/接触率最高。在美国，血清反应阳性率兽医为 22%，而总人口为 3%[25-26]。2010—2011 年，荷兰奶牛场生活和（或）工作的人群中有 72%呈血清反应阳性[27]。2010—2012 年，加拿大安大略省绵羊和山羊农场工人中有 65%血清反应呈阳性[28]。

贝纳柯克斯体通过气溶胶和风传播已得到公认[17-18]。已知的最大规模 Q 热暴发发生于 2007—2010 年的荷兰，与奶山羊养殖有关[29]，并通过空气传播给了附近人群，40 000 多人被感染，4000 多例病例记录在案[30]。通过咳嗽产生的气溶胶导致医院内传播罕有报道[31]，分娩受感染患者期间感染产科工作人员的事件也鲜有报道[32]。如果没有适当预防措施，可能在实验室环境中感染贝纳柯克斯体，尤其是培养该菌时更应注意。实验室工作人员中暴发贝纳柯克斯体感染曾被多次报道，多数病例发生在 1976 年之前[33]。该菌性传播途径也已受到关注，与性传播相关的病例也有报道[34]。

人类 Q 热流行病学的影响因素包括：贝纳柯克斯体全球分布、非常低的人感染剂量（1～10 个贝纳柯克斯体活体细胞）[35]。有益于传播的环境条件，如大量的感染动物、高妊娠率、适宜的环境条件（干燥条件更易传播）、风力和方向[29]；贝纳柯克斯体菌株间差异；人类对贝纳柯克斯体敏感性的固有变异性。尽管有些人暴露后发病，但其他人暴露后或是无症状血清转化，或是仅有轻微症状而无须就诊。人群自然暴露后患病率为 10%～40%[30,36]。

四、临床意义

易感宿主吸入贝纳柯克斯体后，肺泡巨噬细胞可将其吞入胞内[37]。在巨噬细胞内贝纳柯克斯体转运至内体纳虫泡(PV，类似于吞噬体)。与典型的吞噬体相似，PV 具有低 pH 环境；但有证据表明，贝纳柯克斯体可调节改造 PV 以增强其自身生存和复制能力[8]。暴露于酸性环境导致该生物体从 SCV 转变为 LCV 形式，并激活新陈代谢。贝纳柯克斯体表达功能完备的Ⅳ型分泌系统，该系统将效应蛋白分泌到被感染细胞胞质当中[38]。通过遗传筛选已鉴定出超过 100 种贝纳柯克斯体Ⅳ型分泌系统效应蛋白，但其大多数功能尚不清楚[39]。PV 通过细胞内自噬途径和自噬体融合而不断增大[40]。贝纳柯克斯体 PV 拥有吞噬小体的许多功能，包括低 pH、溶酶体膜蛋白(LAMP-1)和蛋白酶(Cathepsin D)。Ⅳ型分泌系统还分泌蛋白质以抑制宿主细胞凋亡、促进宿主细胞存活。据认为，抑制宿主细胞内在的凋亡途径对延长体内贝纳柯克斯体感染至关重要[41]。

贝纳柯克斯体感染会诱导白介素-1β 的合成和细胞炎性小体的形成，但贝纳柯克斯体似乎能够阻断伴随炎性小体发生的细胞凋亡[42]。贝纳柯克斯体感染还能诱导强烈的抗体和 T 细胞介导的免疫反应，两者在清除细菌感染中发挥作用[43]。在未治疗或无(或很少有)临床症状的情况下，大多数感染会被清除。少数情况下感染会持续存在，并可能导致慢性疾病，例如心内膜炎、血管感染或骨骼和关节感染等。这些感染持续存在的原因尚不清楚。动物研究表明，免疫抑制因子白介素-10 的过量表达可能发挥一定的作用，但亦可能涉及多种宿主和病原体因素[44-45]。贝纳柯克斯体通常感染单核/巨噬细胞谱系，但是在体外它可以感染多种类型细胞。它可以在胎盘滋养细胞中旺盛生长，从而导致与被感染的人或动物胎盘接触有关的高传播性风险[14]。

诊断慢性 Q 热需要确定感染的存在，这通常难以做到。常规超声心动图检查很容易遗漏 Q 热性心内膜炎，其中原因包括赘生物(vegetation)体积小或者没有赘生物。许多慢性 Q 热患者首先出现严重并发症，例如，心内膜炎瓣膜功能障碍或血管性慢性 Q 热动脉瘤破裂，并伴较高死亡率[46-47]。为防止严重并发症，早期诊断和定位慢性 Q 热、早期干预，至关重要。

通常在心内膜炎方面，基于改良的 Duke 标准与超声心动图上的心内膜受累是其主要的诊断标准之一[48-49]。然而，Q 热性心内膜炎诊断通常更为复杂，超声心动图检查很少能捕捉到赘生物[50]，这也是为何将高滴度Ⅰ相 IgG 加入更新的 Duke 标准中作为主要诊断指标的原因。对于慢性 Q 热疑似患者[核酸扩增试验(NAAT)阳性，无急性 Q 热感染或急性感染 3 个月后Ⅰ相 IgG 滴度＞512]，经胸超声心动图检查正常且没有非心血管慢性 Q 热证据时，应推荐行经食道超声心动图检查[51]。一般而言，在血管感染诊断方面已证明了^{18}F-氟脱氧葡萄糖正电子发射断层扫描 CT (^{18}F-FDG-PET/CT)的有效性[52]。在心脏瓣膜中增加^{18}F-FDG 摄取作为 Duke 标准的主要指标可以将心内膜炎确诊率提高 1.9 倍。基于^{18}F-FDG-PET/CT 的血管感染患者，Q 热相关死亡率显著增加(24% *vs.* 2%)[53]。如果怀疑患有慢性 Q 热，应考虑使用^{18}F-FDG-PET/CT 诊断血管感染及其并发症(图 68-2)。

五、标本的采集、运输和储存

用于诊断人类 Q 热的标本包括全血、血清、脓液和组织，其中组织标本通常来自瓣膜置换手术的心脏瓣膜或血管外科术中采集的标本。样本的种类取决于所进行的诊断试验。全血和血清可用于菌株分离和核酸检测，血清或血浆可用于血清学试验。组织标本最常用于菌株分离、PCR 及免疫组化(immunohistochemistry，IHC)。全血标本必须用枸橼酸钠或 EDTA 管采集。用于分离的标本需无菌采集并迅速冷藏运送；如果无法及时送样培养(2 周内)，那么标本需在运送前及运送中进行冷冻(至少－20℃，－80℃更佳)处理。用于 PCR 的血液及组织标本在运送前及运送中需要冷冻(－20℃)，如果运输及时，则冷藏运输也是有可能的。由诊断实验室固定(fixation)的用于 IHC 检测的标本可在室温下运送，如果运输及时(1 周内)，IHC 标本也可冷藏运输。冷冻组织标本也可进行 IHC 检测，但效果不理想。

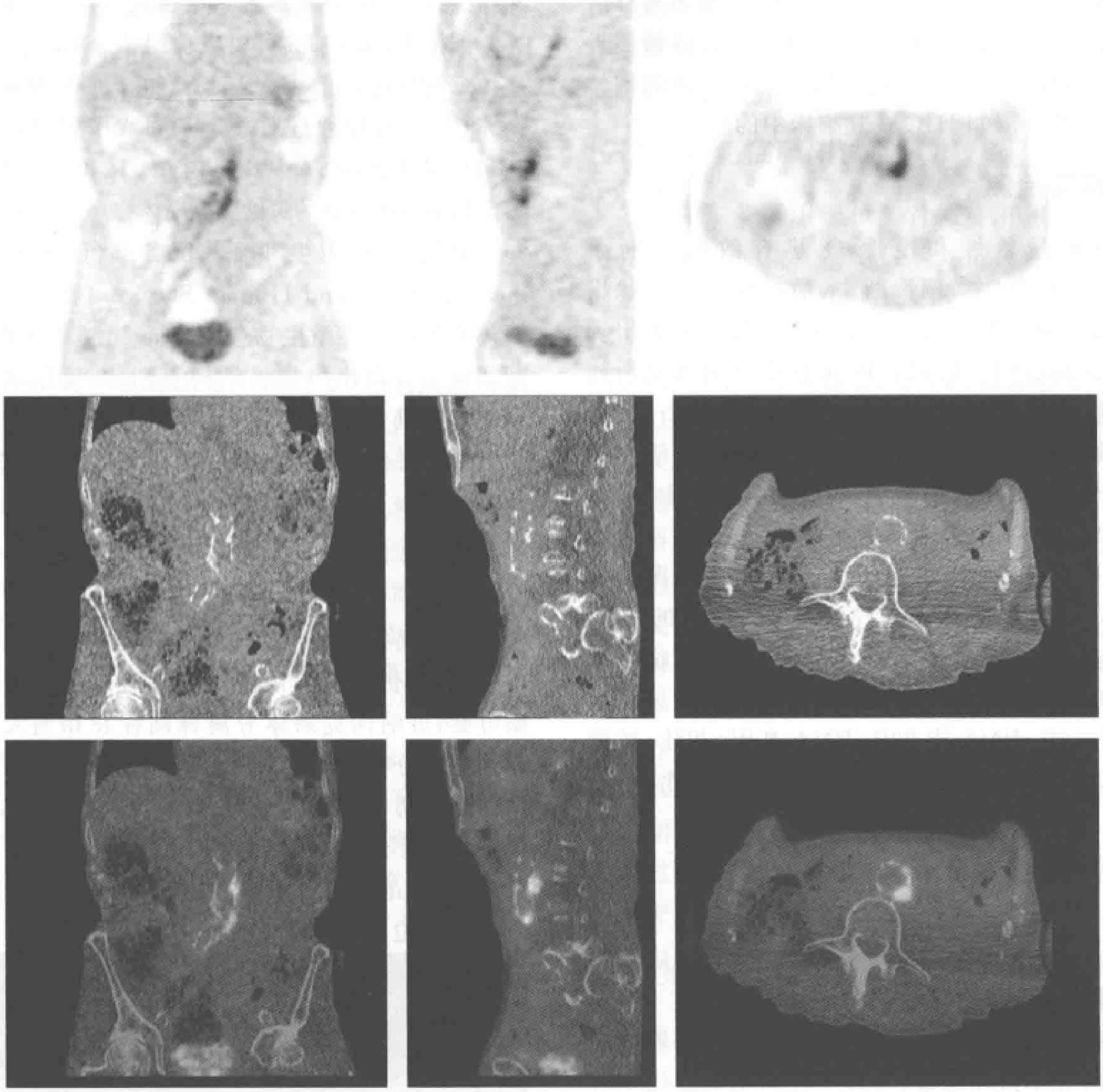


图 68-2 人工血管植入术后感染患者腹部 ^{18}F-FDG-PET/CT 影像

注：(顶部图片)纵向、矢状和横向 ^{18}F-FDG-PET 图像显示腹主动脉中斑片状 ^{18}F-FDG 摄取；(中间图片)纵向、矢状和横向 CT 图像显示人工血管的位置；(底部图片)纵向、矢状和横向组合的 ^{18}F-FDG-PET/CT 图像显示假体周围主动脉壁的斑片状 ^{18}F-FDG 吸收。该 82 岁患者接受了血管修复手术治疗腹主动脉瘤。2 年后出现假体慢性贝纳柯克斯体感染。Ⅰ相 IgG 滴度为 16 384，假体周围脓液 PCR 检测贝纳柯克斯体呈阳性。该患者曾接受强力霉素和羟氯喹治疗，但病情恶化。3 年后的 ^{18}FDG-PET/CT 仍显示由于持续感染导致假体周围局灶性 ^{18}F-FDG 摄取增加，见彩插

采用分子生物学方法或分离技术诊断可疑急性感染时，应在急性期采集全血，最好在抗生素治疗前采集。全血和血清标本在 PCR 和菌株分离检测试验中均可获得阳性结果；两者敏感性孰优孰劣目前尚无定论。采用血清学方法诊断急性感染时，应在急性期采集一份血清样本，发作后 3～4 周采集第二份标本。尽管慢性和急性感染诊断可采用相同类型的标本，但慢性感染诊断标本的采集时间并不十分重要。

六、直接检查

(一)镜检和抗原检测

IHC 很少用于急性 Q 热的诊断，因为该菌传播广泛，合适的组织样本难以获取，因此通常不会收集这些样本。对于有确定感染灶的慢性 Q 热，IHC 是检测组织样本中贝纳柯克斯体抗原非常好的方法，特别是慢性 Q 热期间被病原体定植的心

脏瓣膜组织样本。切出的组织可以用福尔马林溶液固定，并用石蜡包埋，然后用相应的抗体检测贝纳柯克斯体抗原。但是抗贝纳柯克斯体菌的抗体有限，可能会限制 IHC 在其临床中的应用。

(二)核酸检测

PCR 是急性和慢性 Q 热有效的诊断手段[55-56]。在急性病例诊断中，最好在感染症状出现的前 2 周收集全血或血清样本。IgG 抗体出现(症状出现后约 2 周)后，PCR 检测贝纳柯克斯体的能力显著下降。在症状出现后的前 2 周内，PCR 敏感性高于血清学试验，可比单独血清学提供更早期的诊断依据[55-56]。在慢性 Q 热中，切除的感染组织 PCR 检测通常呈阳性；其全血或血清标本 PCR 检测有时可为阳性，但大多数情况下为阴性[46]。因此，应将疑似慢性 Q 热病例的 PCR 结果与其他诊断测试结果相参比，并结合临床综合判断。大量 PCR 分析显示，与扩增单拷贝基因(*com*1，16S rRNA 或 23S rRNA 基因)相比，扩增多拷贝 *IS*1111 插入序列提高了检测敏感性。

七、分离程序

由于感染剂量低且可能产生气溶胶，从人类血液及组织中分离贝纳柯克斯体时必须在 BSL-3 实验室进行，可通过组织细胞培养、鸡胚培养或动物接种(如小鼠和豚鼠)实现。任何感染的组织样本都可用于分离。分离前，可用 PCR 筛选可能含有贝纳柯克斯体的组织样本。贝纳柯克斯体可稳定存在于待分离组织样本中数月[57]。动物接种是最敏感的分离方法。小鼠腹腔注射接种物可达 0.5 ml，接种后 10～14 天收集脾脏。脾匀浆注入其他小鼠、接种未感染的组织培养细胞(置于无菌液体培养基 ACCM-2)中或感染鸡胚进行增殖传代[57-58]。由于动物在扩增贝纳柯克斯体的同时还能清除或抑制其他生物体，因此，动物接种特别适用于除贝纳柯克斯体外还包含其他生物体的组织或环境样本[59]。无菌采集的可能仅含有贝纳柯克斯体的组织样本可直接接种组织培养细胞或鸡胚[57-58]。已报道有效的壳瓶方法可用于在人类胚胎肺纤维母细胞组织培养细胞中进行菌株分离试验[60]，并可与对贝纳柯克斯体感染敏感的其他普通细胞系(如 Vero、RK13、THP1 和 A549)一起使用。鸡胚接种特别适用于大量贝纳柯克斯体繁殖制备抗原。据报道，ACCM-2 可以成功用于分离试验，但也应注意的是它不可能适用于所有基因型的贝纳柯克斯体[58,61]。可以通过对关键基因或序列(如 *com*1、*IS*1111 或 16S rRNA 基因)进行 PCR 和(或)测序来鉴定培养物中可疑的贝纳柯克斯体。

目前，美国卫生和公共服务部(U. S. Department of Health and Human Services)将贝纳柯克斯体列为限制性微生物(select agent)。如果某诊断实验室分离出一株贝纳柯克斯体，美国联邦法规要求将其于 7 天内报告给“联邦限制微生物计划”组织，并将其销毁或转送至指定授权实验室。

八、分型系统

以分离株间遗传学差异为基础的分型系统尚未标准化，仍有待发展。尽管没有普遍接受的分型方案，贝纳柯克斯体分离株间存在相当大的变异性是十分明确的。SDS-PAGE 通过限制性核酸内切酶剪切 32 株贝纳柯克斯体分离株 DNAs，产生了 6 个不同组(groups)[62]，基因间区多间隔序列分型(multispacer sequence typing)产生超过 30 个不同等位基因组合，归并为 3 个主要簇(clusters)[63]。单核苷酸多态性分析法已发展成可以基因组序列及多间隔序列分型数据为基础对贝纳柯克斯体进行分型，与之前鉴定的 6 个基因组(genomic groups)分型和 35 个多间隔子序列基因型分型有很好的相关性[64]。

九、血清学试验

贝纳柯克斯体抗体检测是诊断 Q 热最常用的方法。目前主要使用的血清学试验是间接免疫荧光抗体试验(indirect fluorescent-antibody，IFA)、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA)和补体结合试验(complement fixation test，CFT)[65]，IFA 法是金标准，且最常使用。CFT 法通常敏感性低，目前不常用[65]。贝纳柯克斯体在自然界中广泛存在且许多人暴露并出现血清反应阳性，血清学试验的感染诊断因此变得复杂。大多数血清学方法利用在组织细胞或鸡胚中生长的贝纳柯克斯体抗原。血清学方

法也充分利用了毒力Ⅰ相和毒力减弱Ⅱ相贝纳柯克斯体分离株间本身自带的抗原差异特征[11]。Ⅰ相菌株有完整LPS抗原而Ⅱ相菌株缺乏完整的LPS抗原。人类自然感染过程中，以特定的时间顺序产生抗体以应答Ⅰ相型和Ⅱ相型菌株。急性应答主要针对Ⅱ相菌株抗原，慢性感染的应答为Ⅰ相和Ⅱ相抗体的混合。

(一)IFA试验

IFA试验检测针对Ⅰ相和Ⅱ相抗原的IgG、IgM和IgA型抗体，并用于检测和区分急性和慢性感染[66](图68-3)。在获得合适标本的情况下，IFA法诊断Q热具有很好的敏感性及特异性。急性Q热诊断依赖于血清转化，即患者急性期与恢复期标本中针对Ⅱ相抗原的IgG抗体滴度4倍增加[48]。慢性Q热诊断不能单独依赖抗体滴度。临床表现符合慢性Q热且Ⅰ相IgG滴度高(如>512)对慢性Q热的诊断是必需的[48,67]。然而，急性或慢性感染抗体滴度临界值(cutoff titer)的选择应由各实验室制订，因为抗原制备、分析方法及结果解释可能存在差异。理想上，参考实验室应提供已知的阴性及阳性标本作为质控品，用于实验室分析确认及临界值确定。但对于不具备自制

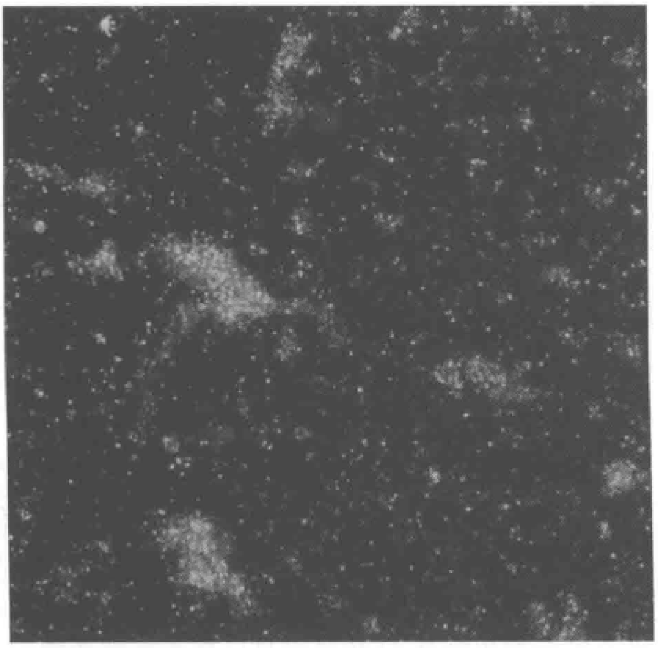


图68-3 IFA用于检测抗贝纳柯克斯体抗体。将Nine Mile Ⅱ相贝纳柯克斯体菌用丙酮固定在载玻片孔内，抗贝纳柯克斯体抗血清经1:512稀释后加入孔中，最后用异硫氰酸荧光素偶联的抗IgG抗体进行检测。该视野显示了载玻片上贝纳柯克斯体菌的阳性结果，见彩插

抗原的实验室，FDA批准的商业化贝纳柯克斯体IFA检测可以用于急性和慢性Q热的诊断(Focus Diagnostics,Cypress,CA)。

(二)酶联免疫吸附试验

已有许多可用于检测针对Ⅰ相和Ⅱ相贝纳柯克斯体的人IgM和IgG抗体的商业ELISA试剂盒。但这些产品目前在美国仅用于研究目的。在美国以外的地区也有了用于临床诊断的ELISA产品。对市售ELISA试剂盒的评估报告表明，ELISA与IFA有着相同的特异性；但也有一些关于其敏感性降低的报道出现[65,68-69]。许多参考实验室及科研机构也已自建ELISA方法。对于急性Q热的诊断，如果获得了恰当时间点的临床样本，则有定量ELISA产品可以监测Ⅱ相滴度的上升[69]。其可实现自动化流程的潜质使得ELISA在大批量样本检测方面(例如疾病大暴发或血清学流行病学研究)具有竞争力，但临界值可能需要针对特定应用进行调整[68]。ELISA不太可能用于诊断慢性Q热，因此不推荐使用[70]。当前Q热诊断标准基于IFA效价，且通过ELISA对Ⅰ相IgG效价的定量检测尚未接受评估。

(三)CFT试验

随着IFA和ELISA方法的不断进步，以及CFT法检测敏感性较低和耗时较长，CFT已极少用于临床诊断，但仍常用于兽医诊断[65]。CFT无法区分IgM和IgG抗体。

十、抗菌药物敏感性

体外抗菌敏感性试验并不常规实施。贝纳柯克斯体为胞内病原菌，体外感染的组织培养系统抗生素MIC值与感染患者体内抗菌药物活性的相关性并不确定。在体外，贝纳柯克斯体对以下抗菌药物敏感：强力霉素、喹诺酮类、甲氧苄氨嘧啶/磺胺甲基异噁唑、大环内酯类和利福平[71-72]。环丙沙星具有一定的抗菌作用，但不如其他喹诺酮类药物有效[72]。尽管强力霉素耐药在临床上可能不是一个普遍问题，但确实存在对强力霉素耐药的贝纳柯克斯分离株[73]。其耐药性的机制和程度尚不清楚。

十一、结果的评价、解释和报告

Q热的诊断取决于对临床影像学资料和实验室检测结果的综合评估,包括血清学、分子诊断学和影像学等资料。由于该菌在人群中暴露/接触的水平较高,血清学试验结果可能反映的是以前暴露/接触情况,而非现症或持续的感染。在美国,Q热是一种需要上报的疾病,需要将其诊断报告给政府卫生部门。

(一)急性Q热

其诊断依赖于PCR和血清学试验。在感染最初的10～14天,全血和血清样本的NAAT通常呈阳性[56],而相应抗体的产生需要10～14天才能检测到,因此,对实验室结果的解释应始终要考虑疾病的发病时程(起病的第1天)。基于血清学的诊断,应在疾病的急性期采集一份血清,在3～4周后的恢复期再采集一份血清。若患者表现有发热、肺炎或肝炎急性疾病体征,并伴有以下至少一种情况,则可确诊为急性Q热[48]:①双份血清通过IFA检测后,结果显示,血清学(阴转阳)转变或出现抗贝纳柯克斯体Ⅰ相抗原IgG抗体效价发生4倍变化;②PCR检测到患者临床样品中存在贝纳柯克斯体DNA;③通过IHC检测到患者临床样品中存在贝纳柯克斯体菌;④通过培养从临床标本中分离出贝纳柯克斯体菌。

急性Q热已有多种治疗方案,但强力霉素是其首选治疗方案。不建议无症状者或症状缓解者常规治疗,但对于有慢性Q热高风险的患者,可考虑采用该疗法。如因过敏而禁用强力霉素时,可以使用其他抗生素治疗方案,包括莫西沙星、克拉霉素和甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲异噁唑。患有急性Q热的患者应接受详细的临床评估,以确定他们是否有进展为慢性Q热的危险。这些患者在随访期间需要密切观察,有时需要延长治疗时间。

(二)慢性Q热

诊断慢性Q热相对困难,应基于临床资料、实验室和影像学标准进行综合评估。患者具有慢性Q热血清学特征,未接受进一步治疗,症状最终消退的情况并不少见,因此,仅血清学结果不足以建立慢性Q热的诊断。在没有急性感染的情况下,在血液或组织中检测到纳柯克斯体菌可确诊,但大多数患者血液标本PCR结果呈阴性[46],而其组织样本通常又很难获得。在慢性Q热中,无慢性病危险因素的患者Ⅰ相抗体升高,IgG滴度＞512,而在具有危险因素[如免疫功能低下、存在动脉瘤、人工血管(vascular prosthesis)、先天性心脏病、严重瓣膜功能障碍、人工心脏瓣膜]的患者中,IgG滴度＞256,应针对慢性Q热感染行进一步诊断评估。关于诊断慢性Q热的最佳标准存在争议。荷兰基于文献的共识性指南似乎是最热门和最容易使用的标准[74]。

不应仅根据滴度增加来治疗慢性Q热。已确诊患有慢性Q热的患者(包括Q热性心内膜炎患者)始终需给予抗生素治疗。慢性Q热的治疗和管理决策颇具有挑战性,因此建议咨询传染病专家。已有报道显示强力霉素和羟氯喹组合可有效减少Q热性心内膜炎患者的不良结局[75-76]。慢性Q热的治愈应基于影像学检查结果(如果起初诊断为异常)、血清滴度下降和症状改善。医务人员应利用血清学试验作为工具,确保治疗期间Ⅰ相IgG滴度在动态下降,而不是依赖于设定的临界滴度。Ⅰ相IgG和IgA降低4倍、Ⅱ相IgM完全消失,是Q热性心内膜炎患者有利的预后指标[75]。针对儿童慢性Q热的可用数据有限。

怀孕期间禁用强力霉素,因为它对胎儿有危害(FDA妊娠D类)。甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异噁唑可能是其最安全的替代品(FDA妊娠C类)。CDC目前建议使用甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异噁唑治疗妊娠期急性Q热患者,直到妊娠的最后6周为止。对Ⅰ相IgG滴度大于1:1024的妇女产后给予强力霉素和羟氯喹12个月[48]。

(三)随访

急性Q热过后,无慢性Q热风险的患者应于半年后接受临床和血清学方面的评估[48,77]。当Ⅰ相IgG滴度＜1024且临床症状未提示慢性感染时,可以停止随访。患有瓣膜病或有因其他原因极有可能发生慢性Q热风险且已接受抗菌药物治疗12个月的患者,应接受2年的血清学监测[77]。对于未接受抗菌药物治疗的免疫功能低下的患者或其他具有慢性Q热危险因素的患者,建议在原发感染后3、6、12、18和24个月进行血清学监测[48]。在治疗慢性Q热期间,应每3个月对患者

进行1次临床监测。血清学检查和PCR检查应每3个月进行1次。当怀疑有新的并发症时，应根据临床指征，重复进行超声心动图、CT和(或)^{18}F-FDG-PET/CT成像检查[53]。慢性Q热感染治疗结束5年后复发病例已有报道[75]。因此，建议继续用血清学和PCR方法进行监测，至少随访5年[48,77]。

十二、特别注意事项

气溶胶传播、环境稳定性、低感染剂量，以及历史上有将其武器化处理等特点，使得贝纳柯克斯体菌成为潜在的生化武器。因此，在美国，它被划归为限制性微生物。从事Q热诊断测试的实验室应了解有关拥有和处置含有贝纳柯克斯体活菌样品的规定。贝纳柯克斯体菌成为潜在生物武器的因素也带来了实验室获得性感染的风险。尽管常规诊断标本可以在BSL2条件下通过适当操作方法和个人防护设备进行评估，但贝纳柯克斯体菌的培养和感染组织的操作，特别是怀疑含有高浓度活菌的标本(如胎盘、心脏瓣膜或血管组织)，应在BSL3实验室中谨慎进行。本章中的结果和结论源自本文作者，并不一定代表疾病控制和预防中心的观点。

参考文献请扫二维码查阅

第69章　惠普尔养障体

WALTER GEIßDÖRFER, ANNETTE MOTER, CHRISTIAN BOGDAN

(王红梅　译;徐元宏、穆红　审校)

惠普尔养障体(*Tropheryma whipplei*, *T. whipplei*)是经典惠普尔病的病原体。1907年,美国病理学家 George Hoyt Whipple 首次发现了惠普尔病,并将这种系统性感染性疾病称为肠脂肪营养不良[1-3]。以后,在中枢神经系统、心脏瓣膜、关节或其他器官的感染中也发现了惠普尔养障体。过去20年的大量研究使人们对这种细菌的流行病学、生物学、致病性和免疫控制产生了很多新的见解。然而,由于惠普尔养障体感染的罕见性、症状的多样性和非特异性、病原体的苛养性及缺乏血清学试验,其早期诊断仍然是临床医生和微生物学实验室面临的挑战[3]。

一、分类学

1991年,Wilson 等对小肠活检标本进行16S rRNA 基因片段的扩增和序列分析,鉴定出"惠普尔病相关细菌"[4]。起初命名为"*Tropheryma whippelii*",来源于"trophe"和"eryma"(希腊文中的"营养"和"屏障"),后于2001年更名为 *Tropheryma whipplei*[5]。*T. whipplei* 在 GC 含量高的革兰阳性细菌(放线菌)中具有特殊地位,由于其16S rRNA 基因序列与其他放线菌的同源性较低(<92%),其基因组较小(约930 kbp)及 GC 含量较低(46.3%)[7],目前还不确定是否归属于微球菌目[6]。

二、病原学描述

(一)形态学

虽然惠普尔养障体被分类为革兰阳性放线菌,但其革兰染色着色不良、抗酸染色呈阴性。当惠普尔养障体聚集在吞噬细胞内的吞噬空泡中或作为胞外菌时可以被检测到[8]。由于其独特的三层包膜糖蛋白结构,其细棒状结构对过碘酸-希夫(periodic acid-Schiff, PAS)染色反应良好[5,9]。在巨噬细胞降解细菌后,细胞包膜的残留物作为细胞内 PAS 阳性包涵体而被留下[9]。

(二)培养

最初报道发现,惠普尔养障体能在被白介素-4[10]灭活的人巨噬细胞中生长,而后又有报道发现,惠普尔养障体能在人成纤维细胞系[8]中培养并被分离,自此以后,惠普尔养障体菌株可以从各种临床标本中分离得到,包括心脏瓣膜、血液、十二指肠活检标本[11]、脑脊液[7]、关节液[12]、玻璃体液[13]、皮肤[14]、唾液[15]和粪便标本[16]。由于基因组数据显示惠普尔养障体缺乏氨基酸合成所必需的多数基因,为此建立了用培养基补充缺失氨基酸并混合胎牛血清的无细胞培养方法[17]。然而,即使是优化和标准化的培养方案,惠普尔养障体对培养仍不敏感,且费时费力(平均检测所需生长时间30天[1];倍增时间是28h[8,17]),不适宜作为惠普尔养障体感染诊断的常规方法。

(三)基因组

两个基因组测序的数据显示,*T. whipplei* 基因组减小(<1 Mbp)且缺乏关键生物合成通路相关基因。另一方面,细胞表面蛋白丰富,包括一个 *T. whipplei* 特异性表面蛋白(specific surface proteins)家族。重复序列元件可能在基因和抗原性变异中发挥作用,提示惠普尔养障体存在宿主依赖型共进化[7]。

三、流行病学和传播

惠普尔病罕见，估计每年的发病率是每10万～100万居民中有1例[1]。惠普尔养障体感染主要局限于欧洲和北美洲白色人种[1]，易感人群为中年（平均年龄56岁）男性（73%）[18]。

惠普尔养障体DNA可从污水处理厂废水中检出，提示这种细菌可在环境中出现[19-20]。惠普尔养障体也可在无症状的健康人中检出，提示该菌可能是共生菌，人类携带者可能是其贮菌所（reservoir）之一[1]。基因分型研究提示惠普尔养障体可以在人群之间传播（可能通过粪-口或口-口途径），因为在法国[21]或塞内加尔[2]农村地区，家庭成员或接触者中出现了相同的菌株。在一名污水处理工人体内，观察到两种不同的*T. whipplei*菌株相继定植[23]。

四、临床意义

（一）发病机制和免疫学

尽管惠普尔养障体大量存在于环境中且人类定植率高，但感染后发生局部或全身性疾病却罕见[24-25]，提示该疾病的发生与机体免疫易感性相关。当前的模型研究显示[1-3,26]，惠普尔养障体主要在幼儿期经口感染，导致暂时性无症状携带状态、自限性胃肠炎、发热或咳嗽，常继而产生保护性体液免疫和细胞免疫反应，从而清除病原体。在易感者中，惠普尔养障体可持续存在数年并蔓延至全身，导致经典惠普尔病，伴随交替活化的巨噬细胞浸润在固有层（图69-1和图69-2），通过这种方式，*T. whipplei*阻断晚期酸性吞噬体成熟为吞噬溶酶体从而得以存活[27-28]。除了通过树突状细胞和T细胞亚型从Th1和Th17转向Th2和调节性T细胞来减少白介素-12（IL-12）的分泌[29]，还有证据表明惠普尔病十二指肠病变患者，其免疫球蛋白阳性浆细胞数量减少，免疫球蛋白分泌受损[30]。目前研究的主题包括与疾病发病机制相关的病原体特征、通过调节宿主免疫反应产生的抗炎环境，以及鉴定有症状的惠普尔养障体感染者的易感因素。

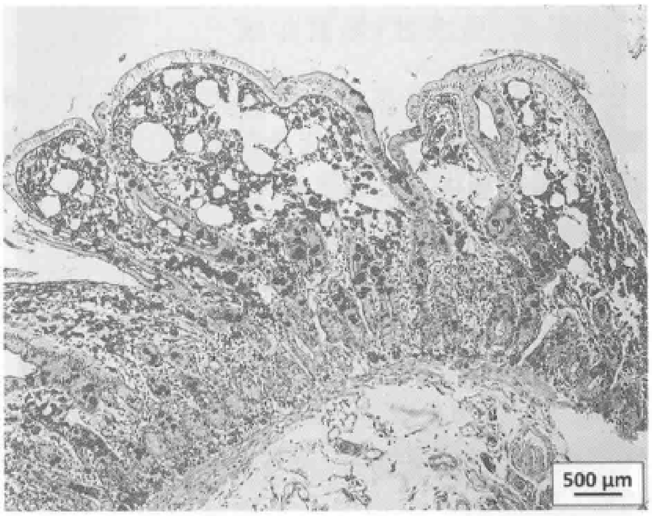


图69-1 十二指肠活检标本PAS染色显示，淋巴管扩张及含惠普尔养障体的PAS强阳性泡沫状巨噬细胞大量浸润固有层（图片由德国柏林病理学家Christoph Loddenkemper友情提供），见彩插

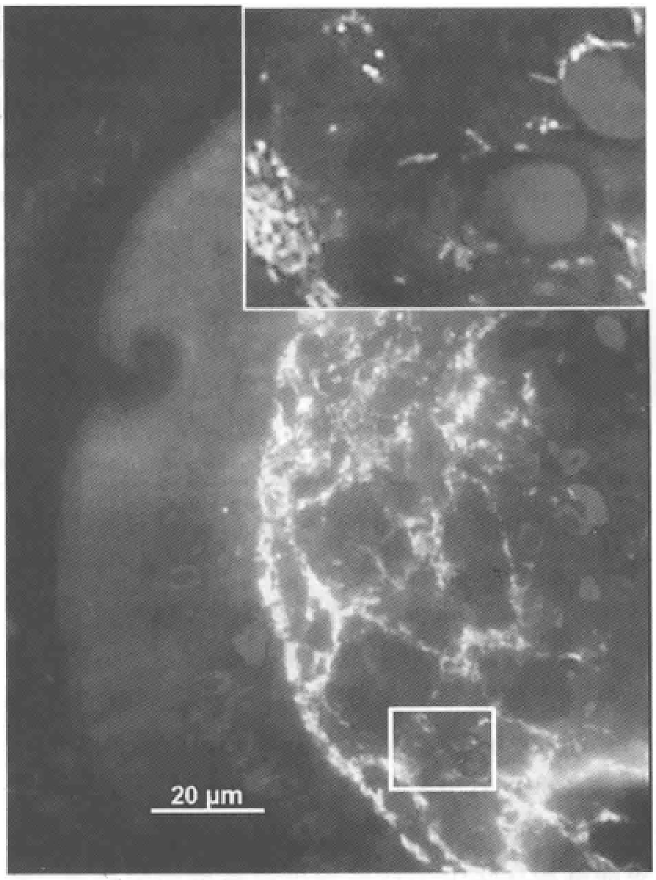


图69-2 采用惠普尔养障体特异性探针对未治疗的惠普尔病患者十二指肠活检进行荧光原位杂交（fluorescence in situ hybridization，FISH）[62]。低倍镜显示在组织微绿色荧光背景下惠普尔养障体细胞群（黄色）。宿主细胞核经4′,6-二脒基-2-苯基吲哚（4′,6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）染色呈蓝色。插图显示高倍镜下单个惠普尔养障体，见彩插

(二)经典(系统性)惠普尔病

对于经典惠普尔病患者而言,在有临床诊断意义的症状出现之前,可能是数年前,已发生过惠普尔养障体感染。以轻度腹泻开始的慢性腹泻是感染的主要症状之一,通常,大关节的游走性疼痛也是明显的症状。前驱期可持续数年,随后患者病情可能迅速恶化,伴随腹泻加重、吸收不良、体重减轻、腹痛和淋巴结病,导致消耗综合征表现。此外,可能出现发热、(夜间)盗汗、乏力等非特异性症状。根据受累器官,还可能出现多种相应的症状(表 69-1)。中枢神经系统受累是经典惠普尔病的严重并发症,可发生于约 1/5 的惠普尔病患者[18]。因为可能发生不可逆性损伤和已报道的抗生素治疗失败[31],其预后不良。由于中枢神经系统受累最常见的仍然是无临床症状,只能通过核酸扩增试验(nucleic acid amplification testing,NAAT)诊断为 *T. whipplei* 感染,因此,在对新诊断为惠普尔病的患者进行抗生素治疗之前,应先采集其脑脊液进行 NAAT 检测。如果结果为阳性,在 6～12 个月的抗生素治疗后,应对脑脊液 NAAT 进行复查,以确保清除中枢神经系统的感染[32-34]。

表 69-1 惠普尔养障体感染的症状和体征

器官系统	部位和(或)标本	症状和体征
一般情况		消瘦、发热、健康状况不良
胃肠道	食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠	急慢性腹泻、腹痛、吸收不良
	粪便	无症状携带者;急性胃肠炎?
	唾液	无症状携带者
关节和骨骼	关节液、滑膜或骨活检标本	关节痛
中枢神经系统	脑脊液	头痛,痴呆,抑郁,癫痫发作,眼肌麻痹
心血管	切除的心脏瓣膜、全血标本	感染性心内膜炎;心脏瓣膜赘生物、瓣膜狭窄或功能不全的症状和体征
	心包积液	心包炎、心肌炎
皮肤	皮肤活检标本	皮肤色素沉着
眼	玻璃体	葡萄膜炎、视网膜炎、视力下降、飞蚊症
淋巴系统	淋巴结	淋巴结病
肺	支气管肺泡灌洗液、胸腔积液、肺活检标本	急性肺炎
肾(罕见)	肾活检标本	继发性淀粉样变性

(三)各器官表现

1. 关节 除了腹泻和吸收不良外,关节病是经典惠普尔病常见的症状之一,甚至可能是唯一的临床症状(表 69-1)。当患者出现游走性单关节炎或者多关节炎时,常被误诊为血清学阴性的类风湿关节炎[35]。这可能导致错误地使用糖皮质激素或肿瘤坏死因子拮抗剂进行免疫抑制治疗,继而使病情急剧恶化。因此,建议:①在对疑似自身免疫性关节炎患者进行免疫抑制治疗前;②免疫抑制治疗效果不佳的情况下,应先对患者十二指肠活检标本进行 PAS 染色或 *T. whipplei* NAAT 检测及对滑膜活检标本或关节穿刺物进行 NAAT 检测[36-37]。分别基于 7 例和 18 例患者的两项研究表明:①惠普尔病除了主要累及大关节外,还可能累及掌指关节和指间关节;②可能发生侵蚀性关节炎;③进行 *T. whipplei* NAAT 检测,关节液标本更优于小肠活检标本;④即使无胃肠道症状,但可通过检测小肠活检标本 *T. whipplei* 进行诊断(如果无法获得关节液);⑤在惠普尔病的诊断上,对小肠活检标本进行 NAAT 检测优于 PAS 染色;⑥停用免疫抑制治疗并进行规律的抗生素治疗可使患者病情完全缓解[38-39]。

2. 中枢神经系统 非特异性神经精神症状可能是惠普尔养障体感染的唯一病理学表现,从眼部运动障碍(如眼咀嚼肌震颤)、癫痫发作、共济失调、头痛到精神障碍,如抑郁、人格变化、痴呆或记忆障碍。磁共振成像(magnetic resonance ima-

ging，MRI）或计算机断层扫描（computed tomography，CT）显示，单发或多发性病变可累及颞叶、中脑、下丘脑和丘脑[40]。诊断往往被延误，需通过 NAAT 检测脑脊液或脑活检标本中的惠普尔养障体。

3. 眼　包含 696 例和 113 例惠普尔病患者的两项研究显示，分别有 2.7% 和 6% 的病例存在眼部受累[18,41]。双眼或单眼可能出现非特异性症状，包括轻度视力丧失、视物模糊、复视、飞蚊症，或神经性眼部表现，如眼肌麻痹、眼球震颤和视盘水肿[42-43]。典型的眼部表现为眼内炎症（葡萄膜炎、视网膜炎、眼内炎）或晶体、角膜病变。在大多数病例中，典型的慢性、皮质激素抵抗型感染是在症状出现若干年后才通过 NAAT 检查玻璃体液得以诊断。一般而言，由惠普尔养障体引起的眼部感染多见于经典惠普尔病，因此也可用其他组织标本进行诊断（如小肠活检标本）。然而，在症状出现的时候，眼球受累也可能是惠普尔病唯一的临床表现[42-43]。

4. 心内膜炎　心内膜炎（图 69-3）可能是惠普尔养障体感染最常见的表现，在法国（Department Rhône-Alpes）[44] 和德国[45]，分别有 8.5% 和 6.3% 的培养阴性的心内膜炎病例是由惠普尔养障体感染所致。心内膜炎可能为典型惠普尔病的并发症（发病率为 6/113 例[18]），但大多数病例为局部感染（发病率为 14/16 例[45]）。这表明，大多数单纯性惠普尔养障体感染的心内膜炎患者可能不存在免疫缺陷状态，推测后者很可能是全身性惠普尔病的易感因素。78% 的患者超声心动图提示存在瓣膜赘生物。关节痛是最常见的（75%）临床症状，而仅有 39% 的病例出现发热。杜克标准对于明确惠普尔性心内膜炎的诊断没有帮助[44-45]。可采用广谱（16S rRNA 基因）NAAT 联合基因测序或 *T. whipplei* 特异性 NAAT 方法检测心脏瓣膜标本从而进行诊断。血液的 NAAT 检测可能有帮助，但其敏感性不足以确诊惠普尔性心内膜炎[46]。

5. 免疫重建炎症综合征　免疫重建炎症综合征（immune reconstitution inflammatory syndrome，IRIS）作为惠普尔病治疗后出现的一种并发症，于 2009 年首次报道[47]，在治疗患者中的发生率高达 11%。优先使用免疫抑制治疗（如当怀疑为类风湿关节炎时），是发展为 IRIS 的危险因素。经过最初的临床改善后，机体针对无生命的惠普尔养障体抗原发生免疫反应，导致发热、关节痛、胃肠道表现及皮肤刺激症状。这种情况下 NAAT 检测的典型结果是阴性。在排除机会性感染之后，皮质类固醇治疗可能有效[48]。

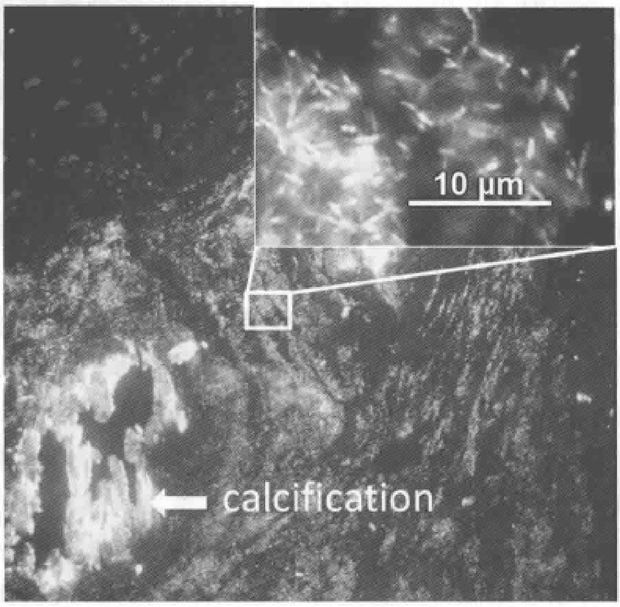


图 69-3　心脏瓣膜横断面惠普尔养障体特异性探针 FISH 图示（Cy3，橙色）[62]。源自 1 例培养阴性的心内膜炎患者。低倍图像显示沿着钙化组织（明亮的黄绿色荧光）有广泛的细菌定植（略带橙色的微光）。宿主细胞核经 4′,6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）染色呈蓝色。插图显示高倍镜下成群惠普尔养障体细胞（橙色），见彩插

6. 急性胃肠炎　腹泻和腹痛是经典惠普尔病的常见症状，这可能是肠道吸收不良和感染的结果。在急性胃肠炎儿童的粪便标本中检出大量惠普尔养障体 DNA[49]。在一项儿童（≤6 岁）随访实验中发现，与没有腹泻的儿童（56/3241，1.7%）相比，在腹泻儿童直肠拭子中检测到惠普尔养障体 DNA 更常见（22/555，4%）[50]。然而，这种不寻常的发现反映的是因果关系还是偶然关联，目前尚不清楚。

7. 皮肤　疾病晚期可出现黑皮病、角化过度、外周性水肿、瘀斑和紫癜的表现。有趣的是，经常能在惠普尔病患者皮肤活检标本中检出惠普尔养障体 DNA，甚至是在没有皮肤症状时[14]。PCR 阴性结果不能排除惠普尔病，但高敏感性 NAAT 可能是检测皮肤标本 *T. whipplei* DNA 的诊断方法[51]。

8. 肺　肺部受累（胸腔积液、肺浸润、肉芽肿性纵隔淋巴结肿大）在经典惠普尔病患者中的发

生率估计为 30%～40%[41]。从间质性肺疾病患者肺实质结节活检标本中检出惠普尔养障体的病例报道很少[18]。*T. whipplei* 作为急性肺炎病因的假定作用需要进一步的研究。HIV 阳性个体的支气管肺泡灌洗液 *T. whipplei* 检出率高于 HIV 阴性个体(13% *vs.* 1%)，这种关联性需要进一步的研究[52]。

9. 健康携带者 惠普尔养障体可在无惠普尔病临床表现的健康人的粪便、肠活检标本、胃液、唾液和牙菌斑标本中检出。虽然早期的研究报道可能因为 PCR 假阳性结果而高估了患病率[53]，但成人无症状定植是公认的。估计粪便和唾液标本中惠普尔养障体的阳性率分别为 4% 和<1%[24-25]。接触惠普尔养障体风险高的人群中阳性率较高(如污水处理工人[25]、无家可归者[54]和惠普尔病患者的家庭成员[21])。经典惠普尔病患者的粪便和唾液中惠普尔养障体流行率(分别为 92%和 65%)和菌体载量远远高于局限性惠普尔病患者或携带者。基于此发现，粪便和唾液标本 NAAT 检测可以作为经典惠普尔病的无创性初筛工具，且具有很高的阴性预测值(99.2%)[14,24]。然而，唾液和粪便标本的 NAAT 阳性结果不能证明感染，NAAT 阴性结果也不能完全排除感染。在塞内加尔和老挝的幼儿粪便标本中 *T. whipplei* DNA 的流行率非常高(75%和 48%)[55-56]。环境标本中 *T. whipplei* DNA 大多呈阴性，而全身性惠普尔病仅局限于白种人，这一发现极有可能反映人体是惠普尔养障体的贮菌所，由粪-口传播而形成早期定植[56]。

五、标本的采集、运输和储存

当怀疑经典惠普尔病时，应对小肠活检标本进行 PAS 染色和 NAAT 检测(图 69-4)。为了避免无明显肉眼可观察到的黏膜病变或 PAS 阳性巨噬细胞分布稀疏或不均导致的抽样误差，应至少评估 5 个内镜活检小肠标本[远端十二指肠和(或)空肠]的 HE 组织学染色或 PAS 染色。如果结果为阳性，应通过 NAAT 检测脑脊液以证实或排除中枢神经系统受累。最近发表的一个替代流程提出，将用高敏感性的 NAAT 法检测粪便、唾液和皮肤活检标本作为诊断经典惠普尔病的第一步[51]，还需要进一步的研究来完善这种流程。诊断单纯性惠普尔养障体感染时，应对受累器官标本进行 NAAT 检测，以及包括 PAS 染色的组织学检测。当获得阳性结果时，应排查胃肠道和中枢神经系统是否受累。

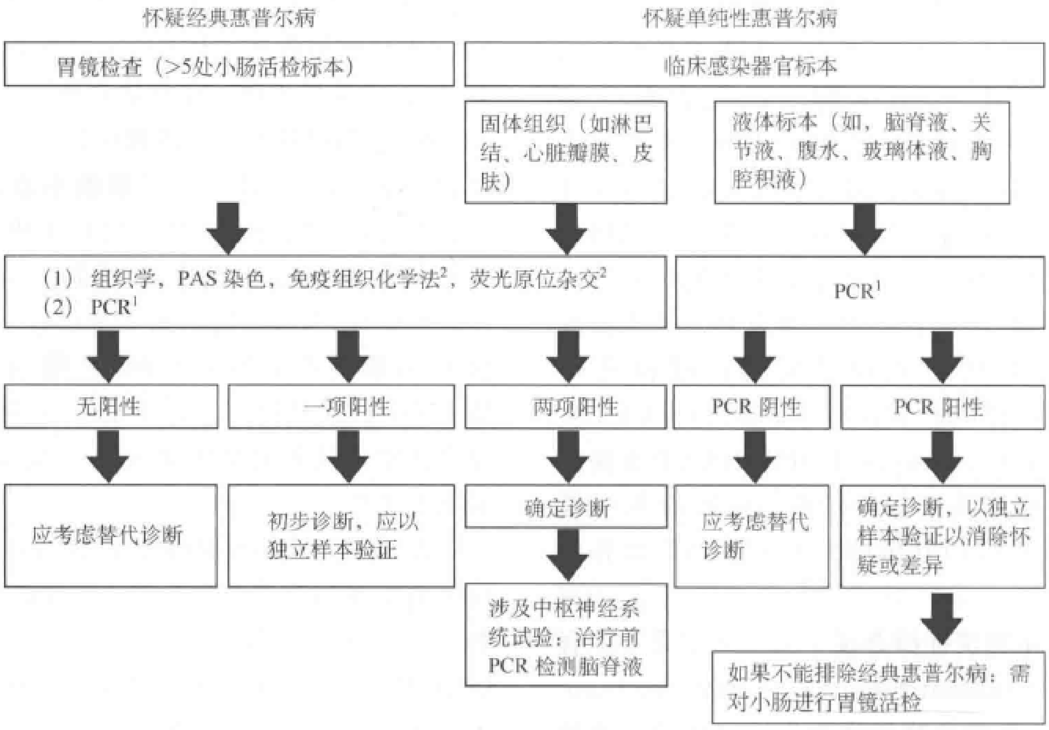


图 69-4 惠普尔病诊断的层次结构[3]，¹PCR 阳性应通过 16S rRNA 基因测序或 PCR 检测惠普尔养障体另一个不同的特异性靶序列进行确证；² 免疫组织化学法和荧光原位杂交仅在专门实验室开展

用于PAS染色、免疫组织化学法(immunohistochemistry,IHC)或荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization,FISH)检测的标本应该用10%的福尔马林固定并在室温下运输。用于NAAT检测时,标本最好不要固定(即无福尔马林预处理);可以在1天内送至诊断实验室的原始组织标本(在无菌生理盐水中)可以在室温下运输。如果在1天内不能完成检测,新鲜标本可在4℃存放数天,在－80℃长期储存。用于培养时,新鲜标本应置于－80℃冷冻,干冰运送。

六、直接检查

(一)显微镜检查

1. PAS染色 十二指肠下段或空肠活检标本PAS染色的典型表现为,巨噬细胞浸润固有层,胞内有被消化的菌体,或PAS阳性淀粉酶阴性的颗粒性包涵体(图69-1)。然而,PAS染色可因感染其他病原菌而呈假阳性(如非结核分枝杆菌),也可因低菌量而呈假阴性结果[57]。因此,每个PAS阳性结果应用独立、特异的方法验证(NAAT、IHC或FISH)。同样地,对PAS阴性而临床持续怀疑惠普尔病时,应用敏感性高的NAAT检测微量惠普尔养障体[1,3,39](图69-4)。

对于无胃肠表现的患者,即使十二指肠活检标本PAS为阴性,而源自受累部位的标本,如移植心脏瓣膜、淋巴结、滑膜组织、脑脊液或脑活检标本,PAS可为阳性[3]。

有经验的病理学家能够基于从PAS强阳性的颗粒物(未治疗的患者)到PAS弱阳性的无颗粒胞质变化(成功治疗的患者)的转变,评估治疗效果[58]。

2. 透射电子显微术 透射电子显微术(electron microscopy,EM)可根据惠普尔养障体独特的3层细胞壁结构,从感染器官的超薄组织切片中鉴别惠普尔养障体[9]。由于电子显微术费力耗时,并且只能在一些专门的实验室开展,因此,仅用于特殊病例分析[57]。

(二)抗原检测

IHC:用多克隆兔抗惠普尔养障体抗体进行免疫组织化学法,能在循环中的单核细胞[59]和不同的组织切片[60]中特异性地识别细菌。与PAS染色相比,免疫组织化学法对未治疗的惠普尔病敏感性和特异性更高,但对治疗后患者不敏感[60]。由于尚无可用的商品化的抗血清,这种方法仅限于少数专业实验室。同荧光原位杂交一样,免疫组织化学法可对PAS染色阳性结果进行验证。

(三)核酸检测

1. FISH 荧光原位杂交是用荧光标记寡核苷酸探针,靶向结合组织切片中惠普尔养障体16S rRNA的分子技术。FISH对肠外组织[45,61-62]中惠普尔养障体的确认和定位,或对小肠活检标本(图69-2和图69-3)PAS染色阳性结果的验证都非常有用。荧光原位杂交探针靶向结合与细菌活性相关的核糖体,而PAS染色在长时间治疗后仍保持阳性。然而到目前为止,利用荧光原位杂交检测惠普尔养障体只限于专业的中心,并且仍被看作是研究技术而不是常规技术。

2. NAAT 虽然PAS染色仍是十二指肠活检标本首选的分析方法,但NAAT的总体性能(敏感性、特异性、出结果时间和操作时间)优于PAS染色[57]。目前还没有FDA批准的检测项目,但主要的参考指南及公众卫生实验室一般使用内部PCR操作规程[63-64],从而对验证和质控程序负责。这点很重要,因为PCR容易发生实验室污染事件(尤其是使用巢式PCR时)或因非特异反应条件或引物设计而出现假阳性结果。例如,在过去,因与龋齿放线菌(*Actinomyces odontolyticus*)的交叉反应而使一些PCR结果呈阳性[53]。采用杂交探针的现代实时PCR方法,在检测特异性和预防DNA污染方面取得了明显改善[25,65]。然而,在分析含有大量、多种微生物并且其中一些细菌无法培养并含有未知DNA序列的这类标本(如唾液或粪便标本)时,仍然存在交叉反应。因此,解释PCR结果时应结合临床和组织病理学检查,并且在初步诊断惠普尔病时,不能仅仅依赖单独的NAAT结果。而应通过另一份独立标本或另一靶序列扩增对PCR结果进行确认,以排除污染或非特异性扩增导致的假阳性;如果PCR以16S rRNA为靶点,应该确定扩增子的序列[1-2,51]。

特异性惠普尔养障体NAAT可以检测所有感染器官的组织或液体标本(十二指肠活检组织、淋巴结、心脏瓣膜、玻璃体、滑膜液或脑脊液)。虽然可以用NAAT检测外周血标本,但阴性结果不能排除感染[66]。通用细菌("真细菌"或"泛细菌")PCR(16S rRNA基因扩增)序列分析的敏感性低

于特异性惠普尔养障体 NAAT，仅适用于高菌量标本的检验，如惠普尔养障体感染性心内膜炎病例中切除的心脏瓣膜[44-45]，但可能无法检出脑脊液中的少量细菌。已有关于 16S rRNA 基因扩增联合二代测序的前期报道，但该联合方法尚未成为常规诊断方案[67-68]。

七、分离程序、鉴定和分型系统

采用长期培养法[8,11,17]从临床标本中分离 *T. whipplei* 具有挑战性，世界范围内仅在极少的实验室建立了这种方法。

流行病学研究中惠普尔养障体的鉴定和分型方法完全基于对 PCR 扩增出的 DNA 序列进行分析，标本可直接检测无须培养。通用靶点如 16S-23S rRNA 的基因间隔区或 23S rRNA 的Ⅲ结构域的分辨率有限，4 个高度可变基因序列的分析提高了分辨率，发现了来自欧洲、非洲、亚洲、北美洲的 140 多种序列类型[1,69-70]。到目前为止，惠普尔养障体的序列类型与致病性、毒力或嗜器官性的关系尚无描述。

八、血清学试验

尽管已经做了一些以惠普尔养障体蛋白作为抗原用于惠普尔病血清学诊断的尝试[71-73]，但目前尚无敏感性和特异性良好的常规诊断方法可用。使用惠普尔养障体细胞培养物作为抗原的间接免疫荧光试验被证明是有问题的，因为对照组免疫球蛋白 G(immunoglobulin G，IgG)反应性比例高，而相当多的患者对惠普尔养障体免疫球蛋白 M(immunoglobulin M，IgM)反应呈阴性[8,73]。

九、抗菌药物敏感性

在体外试验中，*T. whipplei* 对许多抗菌药物敏感，包括青霉素 G、大环内酯类、强力霉素、利福平、氯霉素和复方磺胺甲噁唑[74]。环丙沙星对惠普尔养障体无效[75]。头孢曲松和庆大霉素对胞外细菌有较强的抑制作用，但对胞内细菌无明显抑制作用。惠普尔养障体对亚胺培南的敏感性不一，对甲氧苄啶耐药，因为惠普尔养障体基因组缺乏目标编码基因(二氢叶酸还原酶)[76]。因此，磺胺甲噁唑是甲氧苄啶-磺胺甲噁唑的活性成分，但也有惠普尔养障体临床分离株对磺胺类药物敏感性降低及耐药的报道。

如果不及时治疗，系统性的惠普尔病是致命的。治疗系统性或单纯性惠普尔养障体感染的最佳方案仍不确定。目前推荐的一线治疗方案是：初始以头孢曲松治疗 2～4 周，以彻底清除中枢神经系统中的惠普尔养障体，然后口服甲氧苄啶-磺胺甲噁唑 1 年(表 69-2)[32,78-79]。Biagi 等[80]提出患者经治疗后需终身使用多西环素来预防复发或再感染。大多数患者在 7～21 天内可获得明显的临床改善并最终可完全康复。然而，已报道有甲氧苄啶-磺胺甲噁唑治疗失败和复发的病例[81]。一个具有高效杀菌活性的替代方案是，联合使用羟氯喹和多西环素 1 年，随后终身服用单药多西环素以防复发[81](表 69-2)。羟氯喹被认为能够中和酸性囊泡(惠普尔养障体的复制场所)内的 pH[27-28]，从而达到抑制惠普尔养障体复制的作用。然而，也有联合使用多西环素和羟氯喹治疗后惠普尔病复发的报道[82]。

皮质类固醇辅助治疗可能对脑部受损的患者有益。也有人建议对免疫重建炎症综合征患者使用皮质类固醇[83]。γ 干扰素免疫疗法已成功地应用于 1 例复发患者[84]。

十、结果的评价、解释和报告

对于初次诊断为惠普尔病的患者，应对其检测结果及结果与其临床表现的关系进行评估，并采用另一份独立标本或其他方法进行确认。当 NAAT 检测结果为阳性时，应通过序列分析或选择针对另一段惠普尔养障体特异 DNA 序列重新进行 NAAT 检测，从而对阳性结果进行确认。此外，应考虑检查小肠活检标本和脑脊液。对于 NAAT 检测，新鲜组织标本优于福尔马林固定石蜡包埋标本，因为其敏感性更高，而 DNA 污染(从石蜡包块中提取 DNA 时可能发生)的风险更低。血液标本 NAAT 阴性结果并不能排除感染，因为这种标本类型的敏感性偏低。至于唾液和粪便标本，NAAT 阳性结果并不能区分携带状态和临床感染。

表 69-2 惠普尔病的推荐治疗[3,32,81][a]

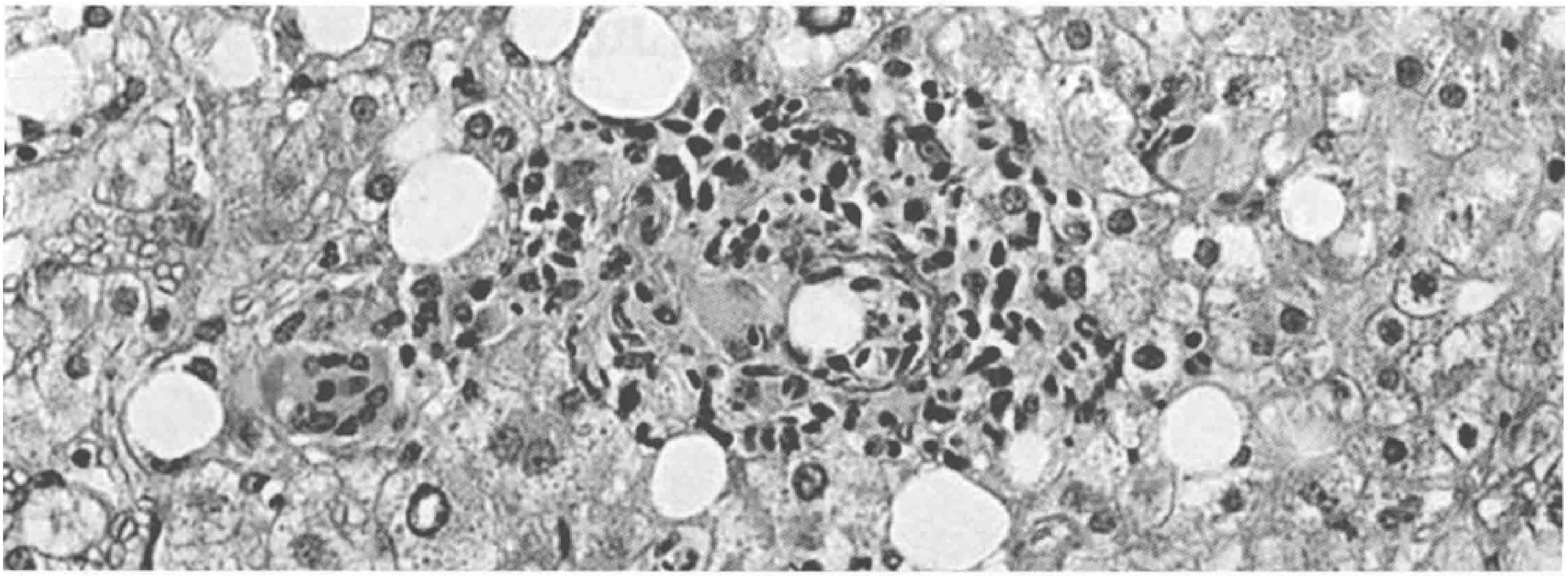
治疗类型	指示	初始治疗(2 周)[b]	维持治疗(≥1 年)
第一线	标准方案	CRO,1×2 g/24 h,i. v. 或者 Pen G, 6×2 MU/24 h,i. v.	TMP-SMX,2×160/800 mg/24 h,p. o.
第二线	对 Pen 或 CRO 过敏	TMP-SMX,3×160/800 mg/24 h,p. o. 加上 STM,1×1 g/24 h,i. m.	TMP-SMX, 2×160/800 mg/24 h,p. o.
	替代(见正文)	DOX,2×100 mg/24 h,p. o. 加上 HCQ,3×200 mg/24 h,p. o.(随后终生服用 DOX)	

注:[a] i. v., intravenously,静脉注射;i. m., intramuscularly,肌内注射;p. o., orally,口服;Pen. penicillin,青霉素;CRO. ceftriaxone,头孢曲松;TMP-SMX. trimethoprim-sulfamettcoxazole,甲氧苄啶-磺胺甲噁唑;STM. streptomycin,链霉素;DOX. doxycycline,多西环素;HCQ. hydroxychloroquine,羟氯喹;[b] 对于中枢神经系统疾病或心内膜炎患者,初始治疗应考虑延长至 4 周[32,79]

一旦实验室确认检出惠普尔养障体,必须制定治疗方案和随访策略。当在诊断、治疗和(或)随访患者的过程中出现任何疑惑或出现并发症时(例如,初次治疗失败或疾病复发),应联系参考中心或专业实验室专家。

参考文献请扫二维码查阅

第三部分 抗菌药物和敏感性试验方法



第三部分 抗菌药物和敏感性试验方法

第9篇

抗菌药物和敏感性试验

第70章 抗菌药物

JAMES S. LEWIS Ⅱ，KAREN BUSH

（伍勇 译；胡云建 审校）

自20世纪20年代青霉素发现以来，抗菌药物治疗在人类感染性疾病的治疗中发挥了至关重要的作用。到目前为止，已经发现或合成了数百种抗菌药物，并且各类抗菌药物中有多种药物可供临床选择应用。然而，抗菌药物的骤增和持续发展的势头，使得临床工作者难以跟上其发展的步伐。同样，抗菌药物的多样化对临床微生物学家决定哪种药物适合纳入常规的或特定的药物敏感性试验也带来了巨大的挑战。

本章主要介绍目前在美国已经上市的抗菌药物，重点介绍它们的作用机制、抗菌谱、重要的药理学参数及毒副作用。同时，选择性地介绍在美国尚未上市的抗菌药物。另外，也将简略提及已经淘汰或正在研究的抗菌药物。

一、青霉素类

青霉素（Penicillin）类（表70-1）是一群天然的或半合成的抗生素，它包含一个6-氨基青霉烷酸的化学核心，这个化学核心由一个并合到噻唑烷环上的β-内酰胺环组成（图70-1a）。这些天然存在的化合物是由许多青霉属细菌（*Penicillium*）产生的。青霉素类抗生素之间的不同在于6号位置上的取代物，该位置侧链的差异可以改变该药物的药代动力学和抗菌性能。

表70-1 青霉素类抗生素

天然青霉素类	阿莫西林
苄青霉素（青霉素G）	氨苄西林
苯氧甲基青霉素（青霉素V）	美西林
半合成青霉素类	羧基青霉素
耐青霉素酶类	替卡西林
氯唑西林	脲基青霉素
双氯青霉素	哌拉西林
萘夫西林	**青霉素与β-内酰胺酶抑制剂复合制剂**
苯唑西林	氨苄西林-舒巴坦
替莫西林	替卡西林-克拉维酸
超广谱类	阿莫西林-克拉维酸
氨基青霉素	哌拉西林-他唑巴坦

（一）作用机制

青霉素类抗菌药物的主要抗菌作用是它们能抑制多种细菌酶，即青霉素结合蛋白（penicillin-binding proteins，PBPs），这些酶能催化肽聚糖合成的最后一个步骤[1]。这种抑制细菌细胞壁酶（如转肽酶）的能力通常对革兰阳性细菌具有杀菌作用。青霉素类抗菌药物的这种作用常常与它们触发膜相关自溶酶的能力有关，后者可破坏细胞壁。

青霉素类抗生素也可以结合细菌内肽酶、细菌羧肽酶，以及既有转肽酶活性又有转糖苷酶活性的双功能青霉素结合蛋白等可介导细菌分裂的酶类[2]。

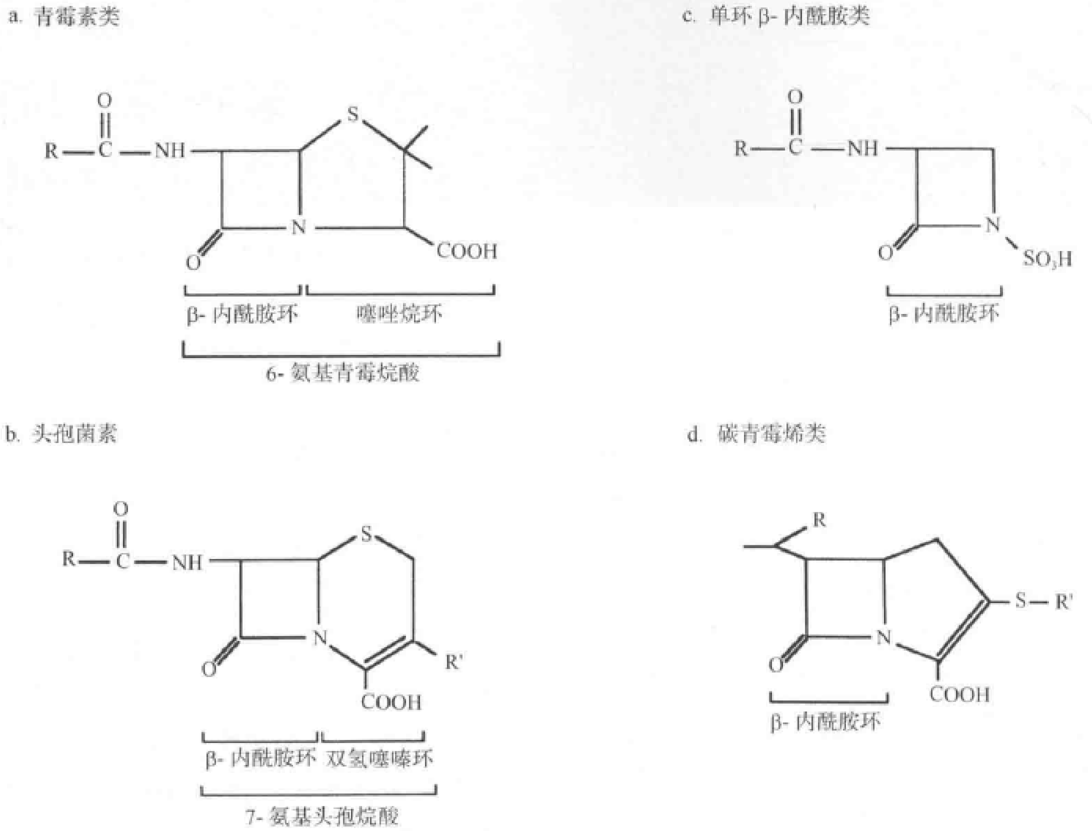


图 70-1 β-内酰胺类抗生素的化学结构

(二)药理学

青霉素类抗菌药物的口服吸收水平显著不同。作为苄青霉素(青霉素 G)的天然同类物，苯氧甲基青霉素(青霉素 V)能抵抗胃酸的灭活作用，和青霉素 G 相比，它能被胃肠道更好地吸收。阿莫西林是氨苄西林的半合成类似物，但它比氨苄西林有更高的胃肠道吸收率(分别为 95% 和 40%)。异唑青霉素(也称为抗葡萄球菌青霉素)、氯唑西林和双氯青霉素具有酸稳定性，也能够被胃肠道吸收，可以口服给药。萘夫西林和苯唑西林只能静脉给药。

青霉素 G 的储存形式(有普鲁卡因青霉素或苄星青霉素两种结合形式)可以延迟肌内注射的吸收。普鲁卡因青霉素 G 在肌内注射 12～24 h 后仍可检测出来，而苄星青霉素 G 可长时间(3～4 周)维持一个极低的血药浓度，这对梅毒的治疗及链球菌性咽炎和风湿热的预防都是极其有效的。

青霉素类抗生素可有效分布于人体的多个部位，如肺、肝、肾、肌肉、骨及胎盘。在没有炎症的情况下，很难渗透进入眼、脑、脑脊液及前列腺。这些药物代谢后，主要通过肾快速排出体外。它们的平均半衰期是 0.5～1.5 h，因此，通常每 4～6 h 给药 1 次，以维持有效的血药浓度。肾小管对青霉素类抗菌药物的排泄可以被丙磺舒(probenecid)阻断，因此，丙磺舒可以延长其在血浆中的半衰期，但这种方法很少在临床实践中应用。当患者肌酐清除率小于 50 ml/min 时，许多青霉素类抗菌药物的给药浓度应该比推荐剂量低，可以通过改变给药剂量或给药频率或者同时改变两者来达到此目的。进行血液透析时，除萘夫西林、苯唑西林和双氯西林外，其余所有青霉素类抗菌药物的剂量都需要调整。在腹膜透析时，许多青霉素类抗生素的剂量也要进行大幅度调整。

(三)抗菌谱

青霉素类抗菌药物对绝大部分革兰阳性菌和多种革兰阴性菌及厌氧菌具有抗菌活性。

青霉素 G 对下列细菌非常有效，包括对青霉素敏感的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*，小于 10% 的分离株)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、酿脓链球菌(*Streptococcus*

pyogenes)、草绿色链球菌群(*viridans group streptococci*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*,很少对青霉素G敏感)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、多杀巴斯德菌(*Pasteurella multocida*)、厌氧球菌(*anaerobic cocci*)、梭菌属(*Clostridium* spp.)、梭杆菌属(*Fusobacterium* spp.)、普雷沃菌属(*Prevotella* spp.)和卟啉单胞菌属(*Porphyromonas* spp.)。但是,耐青霉素肺炎链球菌在全世界的发生率正在增加[3-5]。青霉素G是梅毒和放线菌感染的首选治疗药物。青霉素V的抗菌谱和青霉素G类似。两者均是治疗链球菌扁桃体咽炎的首选药物,也是风湿热的首选或次选预防药物[6]。耐青霉素酶的青霉素类抗菌药物(临床上常使用的3种抗菌药物是苯唑西林、萘夫西林和双氯西林)对产青霉素酶的葡萄球菌非常有效。其抗产青霉素酶的葡萄球菌的活性至少高出其他青霉素类抗菌药物25倍。虽然它们对青霉素敏感的肺炎链球菌和酿脓链球菌也有一定的抗菌活性,但是,其最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration,MIC)高于青霉素G。它们对肠球菌、肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和脆弱拟杆菌(*Bacillus fragilis*)组的某些细菌没有抗菌活性。美西林和替莫西林是目前美国尚未上市的两种青霉素类抗菌药物,它们对包括一些超广谱β-内酰胺酶(extended-spectrum β-lactamases,ESBLs)在内的β-内酰胺酶的水解作用更加稳定。但是,其稳定性的增加是以对革兰阳性细菌的抗菌活性降低为代价的。

氨苄西林和阿莫西林具有和青霉素G相似的抗菌谱,但是,它们对肠球菌和单核增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)更有效。它们是预防感染性心内膜炎的首选药物,尤其是对于患有高风险心脏疾病(正在接受口腔、呼吸道、胃肠道和泌尿生殖系统侵入性治疗)的患者而言[7]。虽然它们对流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)和副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)也很有效,但由于β-内酰胺酶的产生或青霉素结合蛋白的改变,至少有25%的流感嗜血杆菌对其耐药。两者都能被β-内酰胺酶降解,对假单胞菌属和很多肠杆菌科细菌无效。

羧苄青霉素类和脲基青霉素类对耐氨苄西林的革兰阴性菌有很强的抗菌活性。虽然,它们对金黄色葡萄球菌的青霉素酶敏感,但是它们对肠杆菌科和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)产生的β-内酰胺酶的水解作用很稳定。替卡西林是唯一上市的羧苄青霉素类抗菌药物,曾与克拉维酸作为复方制剂使用,但现已停产。

脲基青霉素类抗菌药物在体外比羧苄青霉素类具有更强的抗链球菌和肠球菌活性,它们能抑制超过75%的不产ESBLs的克雷伯菌属[8]。在美国,哌拉西林是唯一在临床上使用的此类药物。在使用之初,它表现出对肠杆菌科和厌氧菌非常出色的抗菌活性,其中,包括脆弱拟杆菌组的细菌。而现在它们可被质粒编码的β-内酰胺酶水解[9],但它们与氨基糖苷类药物联合使用时对治疗铜绿假单胞菌可能有协同作用。目前在美国,正在使用的只有一种哌拉西林与β-内酰胺酶抑制剂他唑巴坦组成的复合制剂。

(四)不良反应

青霉素类抗菌药物常见的不良反应包括过敏性皮疹、腹泻和药物热。严重的过敏反应可能发生在原已被青霉素致敏的患者再次被青霉素激发的情况下,这可以是致命的,但幸运的是,这种反应极少见。大剂量的青霉素G(通常大于30×10^6 U/d),由于其中枢神经系统毒性,可引起肌痉挛性抽搐和癫痫发作。所有的青霉素类抗菌药物在过敏的基础上都有可能引起间质性肾炎。长时间使用苯唑西林有可能引起肝炎。当前可用的许多高剂量青霉素配方与高钠负荷有关,此高钠负荷与低钾血症几乎没有相关性。任何青霉素类抗生素都有可能诱发中性粒细胞减少,尤其是在大剂量长时间(超过数周)使用时。血小板减少和抗球蛋白试验(Coombs试验)阳性的溶血性贫血是青霉素治疗少见的并发症。在使用羧苄青霉素类和脲基青霉素类时可能发生因血小板功能受到干扰引起的出血倾向[10]。虽然假膜性肠炎与所有青霉素类抗菌药物相关,但其多发生于使用氨苄西林时[11]。

二、头孢菌素类

头孢菌素(Cephalosporin)类是顶头孢霉(*Cephalosporium acremonium*,现在称作*Acremonium chrysogenum*)发酵产物的衍生物。它包

含一个 7-氨基头孢烷酸的核心，该核心是由一个β-内酰胺环并合到双氢噻嗪环上而组成的（图 70-1 b）。在 3 号和 7 号位置上不同的取代物可以改变它们的抗菌活性和药代动力学特性。在 β-内酰胺环的 7 号位置上加入一个甲氧基团可以形成一组头霉素类的化合物，该化合物对各种 A 类 β-内酰胺酶（包括许多 ESBLs）的水解作用有很强的抵抗力。

（一）作用机制

头孢菌素与青霉素类相似，也是通过与敏感细菌的青霉素结合蛋白（penicillin-binding protein，PBPs）相结合，从而干扰细菌胞壁肽聚糖的合成而发挥作用[1]。另外，这些 β-内酰胺类药物可通过触发细菌细胞外膜上的自溶酶而发挥杀菌作用[1]。值得注意的是，头孢洛林（ceftaroline）和头孢吡普（ceftobiprole）独特的化学结构与活性之间的关系。头孢洛林和头孢托罗在头孢环的 3 号位置上分别接有一个噻唑基和乙烯基吡咯烷酮部分，这些化学侧链促进药物与金黄色葡萄球菌 PBP 2a 及肺炎链球菌 PBP 2x 的结合，从而对耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌（MRSA）和青霉素及头孢曲松耐药的肺炎链球菌具有杀菌活性[12]。头孢地尔（cefiderocol）是一种铁螯合的铁载体头孢菌素（siderophore-substituted iron-chelating cephalosporin），在革兰阴性菌中被铁转运系统主动吸收，对肠道细菌、铜绿假单胞菌和许多鲍曼不动杆菌分离株具有较强的抗菌活性[13]。

（二）药理学

头孢菌素类抗生素可通过肠外或口服给药（表 70-2）。头孢羟氨苄、头孢氨苄、头孢克洛、头孢丙烯、头孢呋辛酯、头孢地尼、头孢妥仑酯（cefditoren pivoxil）、头孢克肟、头孢泊肟酯和头孢布烯（ceftibuten），其口服给药都具有很好的胃肠道吸收率（60%～90%）。头孢呋辛酯是头孢呋辛的乙酰氧乙基酯，它在肠黏膜脱酯，然后以头孢呋辛的形式吸收进入血流。头孢妥仑酯和头孢泊肟酯是前体药物，它们在体内被吸收，经酯酶水解，分别释放出活性成分头孢妥仑和头孢泊肟。这些药物可以在胎盘和滑膜腔、胸膜腔、心包腔及腹腔液中获得较高的浓度。通常，胆汁中的浓度也较高，尤其是主要通过胆汁排泄的注射用头孢曲松钠。肠外给药的头孢菌素类抗菌药物，如头孢噻肟、头孢曲松、头孢他啶和头孢吡肟，都能穿透血脑屏障进入脑脊液，可用于脑膜炎的治疗。头孢呋辛也能穿透进入有炎症的脑膜，但是，其在脑脊液中的药物浓度不足以对敏感细菌产生杀菌作用。

头孢噻肟在排泄前被转换为脱乙酰形式。除头孢曲松外的所有头孢菌素类抗菌药物主要通过肾脏排泄，对这些药物而言，肾功能不全（肌酐清除率<50 ml/min）的患者必须调整给药剂量。与青霉素类相似，除头孢曲松以外的头孢菌素类抗菌药物，其肾脏排泄途径都可被丙磺舒阻断。一般而言，这类药物可以被血液透析清除，但不能被腹膜透析清除。在头孢菌素类抗菌药物中，头孢曲松具有最长的清除半衰期，为 6.8～8.7 h，在治疗严重感染时，可以实施每天 1～2 次给药。

头孢洛林酯和头孢吡普酯分别是头孢洛林和头孢吡普的水溶性前体药物，静脉给药后，它们能够快速（<1 h）转变为相应的活性形式。头孢洛林的半衰期为 2.5 h，注入 600 mg 最高血清浓度可达 27.9 μg/ml[14]。注入 500 mg 的头孢吡普酯后，其最高血清浓度可达 36 μg/ml[15]。头孢吡普酯的终末半衰期为 3.4 h，经过最小肝代谢后主要随尿排出。对于肾功能不全的患者，在应用这两种药物时都必须调整给药剂量。

（三）抗菌谱

头孢类以非系统性的命名方案分类，这种命名方案是基于其抗菌活性的综合特性或其化学结构（表 70-2）。头孢“代”的通用名称取决于分组的特性，可能有些模糊不清。窄谱头孢菌素（头孢菌素 Ⅰ 或第一代头孢菌素），如头孢氨苄和头孢唑林，对革兰阳性菌有较好的抗菌活性，而对革兰阴性菌的抗菌活性相对较弱。它们对青霉素敏感的金黄色葡萄球菌和青霉素敏感的肺炎链球菌、化脓性链球菌及其他需氧和厌氧链球菌有很好的抗菌活性。耐甲氧西林的葡萄球菌和肠球菌对它们耐药，但是，产青霉素酶的甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌分离株对它们敏感。一些肠杆菌科（*Enterobacteriaceae*）细菌，包括不产β-内酰胺酶的大肠埃希菌（*Escherichia coli*）、克雷伯菌属及奇异变形杆菌（*Proteus mirabilis*）对它们敏感。包括铜绿假单胞菌的假单胞菌属

(*Pseudomonas* spp.)、许多变形杆菌属(*Proteus* spp.)细菌、沙雷菌属(*Serratia* spp.)及肠杆菌属(*Enterobacter* spp.)对它们耐药。这些药物对青霉素敏感的厌氧菌具有抗菌活性,但脆弱拟杆菌(*B. fragilis*)组的细菌除外。另外,这些药物对流感嗜血杆菌有一定的抗菌活性。

表 70-2 头孢菌素类抗菌药物

分类	亚分类[a]	药物[b]
头孢类(口服)	窄谱(头孢菌素Ⅰ或第一代)	头孢克洛[c]、头孢羟氨苄、头孢氨苄
	广谱(头孢菌素Ⅱ或第二代)	头孢丙烯、头孢呋辛(酯)
	超广谱(头孢菌素Ⅲ或第三代)	头孢地尼、头孢妥仑(酯)、头孢克肟、头孢泊肟(酯)、头孢布烯
头孢类(注射)	窄谱(头孢菌素Ⅰ或第一代)	头孢唑林
	广谱(头孢菌素Ⅱ或第二代)	头孢呋辛
	超广谱(头孢菌素Ⅲ或第三代)	头孢哌酮[c]、头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松
	头孢菌素Ⅳ或第四代	头孢吡肟
头霉素类		头孢替坦、头孢西丁
抗 MRSA 的头孢类		头孢洛林(酯)、头孢吡普(酯)[c]
促进铁摄取的头孢类	铁载体头孢菌素头孢地尔	
头孢菌素-β-内酰胺酶抑制剂		头孢拉唑-他唑巴坦、头孢他啶-阿维巴坦

注:[a] 基于 CLSI 词汇表的命名法[309];[b] 括号内的药物是酯的形式,水解后产生具有抗菌活性的头孢菌素;[c] 未获准用于美国临床使用

广谱头孢菌素类(头孢菌素Ⅱ或第二代头孢菌素),头孢呋辛和头孢丙烯对革兰阴性菌的β-内酰胺酶稳定,因此,抗革兰阴性菌的活性增强。虽然这些药物对大肠埃希菌、克雷伯菌属、变形杆菌属(*Proteus* spp.)、某些肠杆菌属和沙雷属的菌株的抗菌活性优于窄谱头孢菌素,但是,它们能被许多肠杆菌科细菌质粒编码的 ESBLs 和碳青霉烯酶水解。它们对包括对耐氨苄西林的流感嗜血杆菌在内的嗜血杆菌属、卡他莫拉菌、奈瑟菌属和许多厌氧菌都有很好的抗菌活性[16-17]。所有这类药物对假单胞菌属均没有抗菌活性。

头孢西丁和头孢替坦属于超广谱头孢菌素类中一个独特化学结构的组(头霉素类),它们对许多厌氧菌有显著的抗菌活性,包括脆弱拟杆菌组的某些细菌,尽管脆弱拟杆菌组对头霉素类的耐药问题越来越严重[18]。在抗革兰阳性球菌活性方面,头孢替坦比头孢西丁的活性低 1/4～1/2 倍,但是,对于敏感的肠杆菌科细菌,头孢替坦比头孢西丁更有效。这两种头霉素类药物对包括青霉素耐药的流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌和淋病奈瑟菌有相同的抗菌活性。它们对脆弱拟杆菌(*B. fragilis*)组的细菌具有很好的抗菌活性,而头孢西丁对普雷沃菌属、卟啉单胞菌属和厌氧革兰阳性球菌的抗菌活性优于头孢替坦。头孢替坦在血浆中有更长的半衰期。两种药物对各种肠杆菌科细菌产生的 ESBLs 均稳定,但它们对于这些细菌引起感染的临床疗效尚不确定。

超广谱头孢菌素类(头孢菌素Ⅲ或第三代头孢菌素)在抗革兰阳性球菌的活性方面不如窄谱头孢菌素(即第一代头孢菌素),但是它们对肠杆菌科的抗菌活性非常强。它们对革兰阴性细菌的超广谱抗菌作用主要是由于它们对低水平染色体编码的β-内酰胺酶及早期质粒编码的青霉素酶稳定[9]。同样值得注意的是,它们具有穿透革兰阴性细菌外层细胞膜的能力[19-20]。这类药物可以分为 2 个亚类:对铜绿假单胞菌有抗菌活性的药物,如头孢他啶和头孢哌酮,以及对铜绿假单胞菌没有抗菌活性的药物,如头孢噻肟、头孢曲松及该亚类中的口服制剂。但是,头孢噻肟和头孢曲松抗链球菌的活性明显强于其他超广谱头孢菌素,而临床应用中并不关注头孢他啶和头孢拉唑对革兰阳性菌的抗菌活性。所有超广谱头孢菌素都能被革兰阴性菌产生的 ESBLs 和碳青霉烯酶水解。头孢他啶与β-内酰胺酶抑制剂阿维巴坦联合应用能够抵消这些酶的作用,少数 OXA 型酶和金属β-内酰胺酶(metallo-β-lactamases, MBLs)除外(见下文)。

头孢噻肟可抑制 90% 以上不产 ESBLs 和碳

青霉烯酶的肠杆菌科菌株，包括那些对氨基糖苷类耐药的菌株，其对大肠埃希菌、变形杆菌属和克雷伯菌属的 MIC_{90}s＜0.5 μg/ml，对黏质沙雷菌（*Serratia marcescens*）、阴沟肠杆菌（*Enterobacter cloacae*）和不动杆菌属（*Acinetobacter* spp.）的抗菌活性有限，对铜绿假单胞菌无抗菌活性。

头孢曲松和头孢噻肟具有相似的抗菌谱，两者对青霉素酶阳性和阴性的淋病奈瑟菌均具有很强的抗菌活性（MIC_{90}s≤0.12 μg/ml）；通常头孢曲松的单剂量治疗就可对此类细菌引起的感染有效[21]。但是，现在已经出现对这些药物敏感性降低的淋病奈瑟菌[22]。由于头孢曲松在血浆中半衰期长（＞6 h），常用于门诊包括莱姆病在内的严重感染患者的抗菌药物治疗[23]。

对于许多肠杆菌科和革兰阳性球菌的抗菌活性，头孢哌酮的效果比头孢噻肟差。然而，头孢哌酮对铜绿假单胞菌仍有一定的临床应用价值，其 MIC_{50}≤16 μg/ml。头孢哌酮抗厌氧菌的活性与头孢噻肟类似[24]。头孢妥仑抗铜绿假单胞菌的活性比其他超广谱头孢菌素类或脲基青霉素类抗菌药物更强，其 MIC_{90} 为 2 μg/ml[25]。在抗肠杆菌科细菌的活性方面，头孢他啶和头孢噻肟类似，但是，在抗革兰阳性球菌活性方面，头孢他啶弱于头孢噻肟，此外，它还对铜绿假单胞菌具有抗菌活性。对于革兰阴性厌氧菌，头孢他啶几乎无抗菌活性。

头孢地尼[26]、头孢妥仑[16,27]、头孢克肟[28]、头孢泊肟[29]和头孢布烯[24]都是超广谱头孢菌素类口服制剂，在治疗产 β-内酰胺酶的革兰阴性细菌方面，它们比窄谱和广谱头孢菌素类口服制剂更稳定。与早期的头孢菌素类抗菌药物比较，这些较新的药物具有相同的抗链球菌活性（MIC_{90}s≤0.06 μg/ml），但是抗甲氧西林敏感的葡萄球菌活性较低（MIC_{90}s＝2 μg/ml）。与头孢噻肟对许多不产 ESBLs 和碳青霉烯酶的肠杆菌科、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌和淋病奈瑟菌的抗菌活性相似，这类药物同样对假单胞菌属、肠杆菌属、沙雷菌属和摩根菌属（*Morganella* spp.）无效。目前，所有头孢菌素类抗菌药物在临床上均不能用于肠球菌感染的治疗。

头孢吡肟是美国批准用于临床的一个超广谱头孢菌素（头孢菌素Ⅳ或第四代头孢菌素），对于高产头孢菌素酶 AmpC 的肠杆菌科具有很强的抗菌活性，这种抗菌活性主要是由于其对 Bush 和 Jacoby 分类 1 组头孢菌素酶有更好的通透性和更强的稳定性[9]。头孢吡肟由于具有两性离子的特征（净电荷为零，显中性），能很好地穿透革兰阴性细菌的外膜。在体外，与头孢噻肟和头孢曲松相比较，头孢吡肟对不产 ESBLs 和碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌具有更强的抗菌活性（MIC_{90}s≤0.1 μg/ml）[30]。在抗铜绿假单胞菌活性方面，头孢吡肟和头孢他啶的活性相当，其 MIC_{90}s≤4 μg/ml，而且头孢吡肟对某些头孢他啶耐药的铜绿假单胞菌菌株同样具有抗菌活性[31]。对于葡萄球菌（MIC_{90}≤2 μg/ml）和链球菌（MIC_{90}≤0.12 μg/ml），其抗菌活性与窄谱头孢菌素相当[31]。但是，在临床上，头孢吡肟不用于抗不动杆菌属、肠球菌或厌氧菌的治疗。

头孢拉唑（CXA-101，FR264205）是一种抗假单胞菌的头孢菌素，对许多肠道细菌、草绿色链球菌，特别是多重耐药（multidrug-resistant，MDR）铜绿假单胞菌（MIC_{90}≤8 μg/ml）具有有效的抗菌活性[32]。头孢拉唑对许多能耐受头孢菌素类、碳青霉烯类抗生素和哌拉西林-他唑巴坦的假单胞菌株具有抗菌活性[25]。但是，头孢拉唑可以被金属 β-内酰胺酶、丝氨酸碳青霉烯酶和许多 ESBLs 灭活。在临床应用中，头孢拉唑只能与他唑巴坦以 2∶1 的比例联合应用；这种联合疗法已被批准用于治疗复杂腹腔内感染及复杂尿路感染。对于肠杆菌科细菌的抗菌活性，头孢拉唑-他唑巴坦与头孢他啶相当，略差于头孢吡肟，其 MIC_{90}≤1 μg/ml。在抗伯克霍尔德菌属（*Burkholderia* spp.）、不动杆菌属、肠球菌和链球菌活性方面，头孢拉唑也与头孢他啶相似。对苯唑西林敏感的葡萄球菌无效（MIC_{50}＝32 μg/ml）[33]。

头孢洛林和头孢吡普几乎对所有葡萄球菌均有活性，包括甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌（methicillin-susceptible *S. aureus*，MSSA）、甲氧西林耐药的金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *S. aureus*，MRSA）、异质性万古霉素中介的金黄色葡萄球菌（heterogeneous vancomycin-intermediate *S. aureus*，hVISA）和万古霉素耐药的金黄色葡萄球菌（vancomycin-resistant *S. aureus*，VRSA），其 MIC_{90}s≤2μg/ml。对多重耐药的肺炎链球菌，其 MIC_{90}s 为 0.5 μg/ml[12,34-35]。草绿色链球菌和乙型溶血性链球菌在其 MIC_{90}s≤1 μg/ml 时生长被抑制。头孢洛林对肠球菌抑菌能

力非常弱，头孢吡普对粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)则呈现出较强的抗菌活性，但对屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)无效[36]。头孢洛林对革兰阴性细菌的抗菌活性主要体现在抗呼吸道病原体，包括产 β-内酰胺酶的流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌(MIC_{90}s 分别为 0.125 μg/ml 和 0.25 μg/ml)和淋病奈瑟菌(MIC_{90} = 0.25 μg/ml)，以及不产 ESBLs 和碳青霉烯酶的肠杆菌科。头孢洛林对铜绿假单胞菌、不动杆菌属和产生可诱导的 AmpC β-内酰胺酶的革兰阴性细菌具有微弱的活性，因此，对于这些细菌没有临床应用价值。但是，在加入阿维巴坦后，头孢洛林对产 β-内酰胺酶菌株的抗菌活性显著增强；这一组合已在复杂性尿路感染(Complicated urinary tract infection，cUTI)的Ⅱ期临床试验中研究（www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01281462）。对产生去阻遏的 AmpC β-内酰胺酶的铜绿假单胞菌和肠杆菌科细菌，头孢吡普的体外抗菌活性与头孢吡肟类似(MIC_{90}s 为 8～16 μg/ml)，但头孢吡普对产 ESBLs 的肠杆菌科和多重耐药的鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)分离株几乎无效[12]。头孢洛林和头孢吡普对厌氧菌的抗菌活性不尽相同，它们对艰难梭菌(*Clostridium difficile*)之外的梭菌属、梭杆菌、乳酸杆菌(*Lactobacillus*)、消化链球菌(*Peptostreptococcus*)、卟啉单胞菌、痤疮角质杆菌(*Cutibacterium acnes*)(痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)和韦荣球菌(*Veillonella*)有很好的抗菌活性，但是对脆弱拟杆菌、某些脆弱拟杆菌组和普雷沃菌属无效[37]。头孢洛林可用于治疗急性细菌性皮肤和皮肤结构感染(ABSSSI)和社区获得性细菌性肺炎(CABP)。头孢吡普仍未在美国上市，但欧洲监管部门批准其可用于医院获得性肺炎(呼吸机相关性肺炎除外)和社区获得性肺炎中成年人患者的治疗。

头孢地尔是一种由邻苯二酚取代生成的含铁载体的头孢菌素(a siderophore-containing catechol-substituted cephalosporin)，目前正处于Ⅲ期临床试验中。它可以抵抗许多 β-内酰胺酶的水解作用，包括 ESBLs 和许多种类碳青霉烯酶[38]。头孢地尔对包括 β-内酰胺耐药的肠杆菌科、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌和嗜麦芽窄食单胞菌等多种细菌的 MIC_{90}s≤2 μg/ml[39-40]。

(四)不良反应

一般而言，患者对于头孢菌素类抗菌药物都具有较好的耐受性。最常见的不良反应是腹泻和过敏反应，如皮疹、药物热和血清病。在青霉素过敏的患者中，与这些药物出现交叉反应的发生率只有 3%～7%[41]。其他不常见的不良反应包括假膜性肠炎、血清肌酐和转氨酶水平升高、白细胞减少、血小板减少和抗球蛋白试验(Coombs 试验)阳性的溶血性贫血。这些不常见的反应通常比较轻微，并且可逆。长时间使用头孢曲松与胆囊淤滞的形成相关[42]，停药后胆泥通常会分解，几乎不会发生胆囊炎。

已有报道指出，头孢替坦和头孢哌酮可引起患者出现双硫仑样反应(disulfiram-like reactions)。这是由于这些抗生素存在与双硫仑化学结构相似的 N-甲基硫醇四唑侧链。低凝血酶原血症和出血倾向也曾出现在这些头孢菌素类抗菌药物的使用过程中。出现凝血功能障碍的原因有：①抗菌药物的使用改变了肠道正常菌群，从而抑制了维生素 K 及其前体的合成。②N-甲基硫醇四唑侧链抑制了维生素 K 依赖的羧化酶，该酶负责将凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ和Ⅹ转化为活性形式，该侧链也阻止了维生素 K 从无活性状态转化为活性状态[43]。另外，值得注意的是，最近认可的神经毒性，主要表现为肾功能不全患者在接受大剂量头孢吡肟治疗时可能会出现意识障碍[44]。2012 年 7 月，美国处方信息在关于使用大剂量的头孢吡肟增加癫痫发作风险方面进行了更新，特别是针对肾功能减退的老年患者。与其他药物比较，使用头孢吡肟可能与死亡风险增加有关，但美国 FDA 尚未认可这些报道[45]。

三、其他 β-内酰胺类

(一)单环 β-内酰胺类

单环 β-内酰胺(Monobactam)类抗生素是由单环 β-内酰胺和链接在单环核心上的各种侧链组成的(图 70-1c)。氨曲南是目前唯一在临床上使用的单环 β-内酰胺类抗菌药物，其他几个单环类药物正在进行早期的临床研发，包括目前正在进行临床试验的 LYS228[46]。

1. 作用机制 氨曲南主要结合包括铜绿假单

胞菌等革兰阴性需氧菌的青霉素结合蛋白3(PBP3),从而干扰细菌细胞壁的合成。许多早期质粒编码或染色体编码的功能分类1组和2组的β-内酰胺酶不能水解氨曲南[9],但它对ESBLs和丝氨酸碳青霉烯酶敏感,易被其水解。氨曲南和分类1组的头孢菌素酶有很高的亲和力,但它并不诱导该酶的产生[47]。金属β-内酰胺酶不能水解氨曲南,因此,对产碳青霉烯酶的革兰阴性菌,氨曲南具有潜在的临床应用价值[46]。目前,氨曲南与广谱β-内酰胺酶抑制剂阿维巴坦(见下文)的联合应用正在临床研究开发过程中。

2. 药理学 通过静脉给药,氨曲南能广泛分布到机体的体液和组织中。在8 h内,其血清浓度超过绝大部分肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)细菌的MIC_{90}s 4～8倍,可以抑制铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)达4 h。氨曲南能通过有炎症的血脑屏障,其药物浓度足以治疗敏感微生物引起的脑膜炎。其血浆中的半衰期为1.7 h,主要经肾脏排泄。肾衰竭患者用药时需要调整剂量。血液透析和腹膜透析均可去除氨曲南。

3. 抗菌谱 氨曲南的抗菌活性限于需氧的革兰阴性细菌,能抑制对其敏感的肠杆菌科、奈瑟菌属和嗜血杆菌属,其MIC_{90}s≤0.5 μg/ml[48]。但是,大部分不动杆菌属、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderiacepacia*)、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)对其耐药。在体外与氨基糖苷类抗菌药物联合应用于对氨曲南敏感的细菌,包括铜绿假单胞菌和一些氨基糖苷类耐药的革兰阴性菌,可有协同作用[49]。氨曲南对革兰阳性菌或厌氧菌无效。LYS228是一种处于临床研究中的全新单环β-内酰胺类抗菌药物。它在体外和体内对肠杆菌科细菌有很强的抗菌活性,包括产生ESBLs、丝氨酸碳青霉烯酶和MBLs[46]。

4. 不良反应 总体而言,氨曲南是一种安全的药物,其毒性和其他β-内酰胺类药物相似。恶心、腹泻、皮疹、嗜酸性粒细胞增多、血清转氨酶轻度升高和一过性血清肌酐水平升高都可能出现。氨曲南与其他β-内酰胺类抗菌药物只有极轻微的交叉反应,因此,对青霉素或头孢菌素过敏的患者可以安全选用氨曲南[50]。

(二)碳青霉烯类

碳青霉烯(Carbapenem)类是目前所有抗菌药物中唯一具有最广泛抗菌谱的一类β-内酰胺类抗菌药物。结构上,它们不同于青霉素类,在6号位置上有一个反式构象的羟乙基侧链,在双环核心上以一个碳原子取代了硫(或氧)原子(图70-1)。该羟乙基侧链具有独特的立体化学构型,使得它对绝大多数β-内酰胺酶稳定。目前,在美国临床上常用的碳青霉烯类抗菌药物有多利培南、厄他培南、亚胺培南和美罗培南[51]。

1. 作用机制 碳青霉烯类抗菌药物和革兰阴性菌的PBP2、PBP1a和PBP1b有很高的亲和力,结合之后使细菌呈球形并裂解[52]。它们能结合葡萄球菌的所有PBPs,但不能结合MRSA上的PBP 2a,因此,碳青霉烯类抗菌药物对MRSA的抗菌活性很弱[53]。除了那些高频率产生的碳青霉烯酶,碳青霉烯类抗菌药物对绝大多数质粒或染色体介导的β-内酰胺酶都很稳定[9]。由于产生了能水解碳青霉烯核心的碳青霉烯水解酶,耐药菌逐渐增多,这些酶包括2 d组碳青霉烯酶(OXA β-内酰胺酶)、2f组丝氨酸碳青霉烯酶(KPC、SME、NMC-A、IMI和GES)和金属β-内酰胺酶(质粒介导的IMP、VIM和NDM,以及在嗜麦芽窄食单胞菌、炭疽杆菌和脆弱拟杆菌中染色体编码的酶)。1组碳青霉烯酶的大量产生,以及能导致摄取药物能力下降的膜孔蛋白的改变,使得肠杆菌科的耐药开始出现。尽管铜绿假单胞菌也存在外排上调以使药物达不到有效抗菌活性所需的浓度的情况,但频繁出现的铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的现象却是药物摄取降低(由OprD膜孔蛋白失活所致)及AmpC产生增加的联合作用所导致的[54]。

2. 药理学 静脉给药后,碳青霉烯类抗菌药物在机体分布广泛,但很少经胆汁排出。亚胺培南在肾脏被脱氢肽酶Ⅰ(DHP-Ⅰ)代谢和灭活,这种酶存在于近曲小管细胞的刷状缘。为了达到足够的血清和尿的药物浓度,DHP抑制剂西司他丁与亚胺培南以1∶1的剂量比联合应用于临床。西司他丁没有抗菌活性,也不改变亚胺培南的抗菌活性。通过阻止有潜在肾毒性的亚胺培南代谢产物在肾小管细胞中的大量聚集,西司他丁对肾起到保护作用。美罗培南、厄他培南和多利培南在双环核心的C-1位置上有一个β-甲基,这使得其能抵抗人肾DHP-Ⅰ的灭活作用。因此,这些药物不需要与DHP-Ⅰ抑制剂联合用药。

多利培南、亚胺培南和美罗培南的药代动力学非常相似，血清半衰期为 1 h。当给药剂量分别为 0.5 g 和 1.0 g 时，血清药物浓度峰值分别是 25～35 μg/ml 和 55～75 μg/ml。这些药物能很好地通过有炎症的血脑屏障，脑脊液中的药物浓度为 0.5～6.0 μg/ml[51,55]。厄他培南与人的血浆蛋白有很高的结合率(>95%)，因此，不能渗透进入脑脊液。其血浆半衰期为 4 h，相对较长，因此，厄他培南的给药频率可以为每天一次。厄他培南单次注射 1 g 剂量时，其血清药物浓度峰值可以达到 155 μg/ml[56]。当肌酐清除率≤50 ml/min 时，这些碳青霉烯类药物需要调整使用剂量。血液透析能去除这些碳青霉烯类抗菌药物和西司他丁。

3. 抗菌谱 一般而言，所有碳青霉烯类抗生素具有相似的抗菌效力，其差别极小。在体外，它们对革兰阳性需氧菌有非常出色的抗菌活性，如葡萄球菌(包括青霉素敏感和耐药的分离株)、草绿色链球菌组，A、B、C 和 G 群链球菌，芽胞杆菌属(*Bacillus* spp.)和单核增生李斯特菌(*L. monocytogenes*)。多利培南和亚胺培南对链球菌和甲氧西林敏感的葡萄球菌的抗菌活性(MIC_{90}s≤0.5 μg/ml)比厄他培南和美罗培南高 2～4 倍。但甲氧西林耐药的葡萄球菌同样对所有碳青霉烯类抗菌药物耐药。虽然碳青霉烯类抗菌药物对青霉素耐药的肺炎链球菌的 MICs 有所升高(MIC_{90}s 为 0.25～2.00 μg/ml)，但绝大多数菌株对这些药物仍然敏感，其中，多利培南和亚胺培南最有效[57-59]。厄他培南对粪肠球菌几乎无效，只有亚胺培南能有效抑制粪肠球菌，其 MIC<4 μg /ml。屎肠球菌通常对所有碳青霉烯类抗菌药物耐药。

包括对其他 β-内酰胺类和氨基糖苷类耐药的菌株在内，超过 90% 的肠杆菌科对碳青霉烯类抗生素敏感，其抗菌效力依次为：多利培南与厄他培南和美罗培南>比阿培南>亚胺培南[60-61]。这些药物对产 ESBL 的肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)和大肠埃希菌(*E. coli*)的临床分离株有很高的抗菌活性，其 MIC_{90}s 为 0.015～0.125 μg/ml[60,62]。当碳青霉烯类抗菌药物浓度≤1 μg/ml 时，大部分肠杆菌属、枸橼酸杆菌属(*Citrobacter* spp.)和沙雷菌属能被抑制。厄他培南对不动杆菌属和假单胞菌属无效。而其他碳青霉烯类抗菌药物在浓度为 2～4 μg/ml 时可抑制大部分铜绿假单胞菌，其中，美罗培南和多利培南最为有效，包括许多对亚胺培南耐药的菌株[54,60]。碳青霉烯类抗生素对洋葱伯克霍尔德菌和施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)有抑制作用，而对嗜麦芽窄食单胞菌无效，因为它能产生染色体编码的金属 β-内酰胺酶[63]。在碳青霉烯类抗菌药物的治疗过程中，现在已经出现了耐药的假单胞菌属菌株。碳青霉烯对产碳青霉烯酶的革兰阴性细菌的抑菌活性一般是较低的，但最近批准的 β-内酰胺酶抑制剂组合美罗培南-瓦博巴坦和正在研发的雷巴坦与亚胺培南-西司他丁的合剂(relebactam with imipenem-cilastatin)在后期临床研究中发现对许多产生丝氨酸碳青霉烯酶的细菌具有可靠的抑菌活性[64-65]。

碳青霉烯类抗生素是抗厌氧菌最有效的 β-内酰胺类抗菌药物，其抗菌活性可与甲硝唑媲美。其对厌氧革兰阳性球菌、梭菌属、脆弱拟杆菌组的某些细菌、梭杆菌属、卟啉单胞菌属和普雷沃菌属的 MIC_{90}s≤4 μg/ml[66-68]。这类药物在体外对放线菌属(*Actinomyces*)、诺卡菌属(*Nocardia*)和非典型分枝杆菌也有抗菌效果，亚胺培南比其他碳青霉烯类抗菌药物对这些细菌更有效[69-70]。

4. 不良反应 碳青霉烯类抗菌药物的不良反应和其他 β-内酰胺类抗菌药物类似。最多可有 5% 的患者会出现恶心、呕吐和腹泻，这些症状通常与厄他培南和亚胺培南的注射给药相关。在碳青霉烯类抗菌药物的使用中也可能出现假膜性肠炎。约有 3% 的患者会出现过敏反应，如药物热、皮疹和荨麻疹。碳青霉烯类抗菌药物与其他 β-内酰胺类抗菌药物可能会有交叉反应，但目前尚未研究透彻。在亚胺培南治疗中，有不到 5% 的患者可能出现病因不明的癫痫发作，尤其是伴有肾功能不全或有潜在的神经系统疾病的老年患者，而其他碳青霉烯类抗菌药物诱导癫痫发作的概率很低(<1%)[58]。在碳青霉烯类抗菌药物的使用过程中，可逆的血清转氨酶水平升高、白细胞减少和血小板减少也可能发生，但目前尚无关于出现凝血功能障碍的病例报道。

(三)β-内酰胺酶抑制剂

1. 克拉维酸 克拉维酸(clavulanic acid)是一种天然的弱抗菌剂，最先在棒状链霉菌(*Streptomyces clavuligerus*)的培养物中发现[71]。它能抑制葡萄球菌的青霉素酶，以及革兰阴性细菌的

多种 2 组 β 内酰胺酶。该药物主要作为“自杀抑制剂”，通过与 β-内酰胺酶形成不可逆的酰基酶复合物，从而导致 β-内酰胺酶活性的丧失。

对产 β-内酰胺酶的葡萄球菌、克雷伯菌属、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌、淋病奈瑟菌、大肠埃希菌、变形杆菌属、脆弱拟杆菌组的某些细菌、普雷沃菌属和卟啉单胞菌属，克拉维酸与各种青霉素及头孢菌素有协同抗菌作用[72]。克拉维酸还可以灭活多种质粒介导的 TEM、SHV 和 CTX-M 型 β-内酰胺酶[72]，这包括存在于头孢菌素耐药的肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌菌株中的 ESBLs。但含克拉维酸的药物对以上这些细菌引起的感染的治疗作用仍不明确。克拉维酸不能抑制肠杆菌属、枸橼酸杆菌属、变形杆菌属、不动杆菌属、沙雷菌属和假单孢菌属中可诱导的和质粒介导的 AmpC β-内酰胺酶(染色体 1 组头孢菌素酶)[9]。事实上，克拉维酸诱导产生的染色体 AmpC 酶可与相伴的青霉素产生拮抗作用，导致青霉素在铜绿假单胞菌等细菌中的抑菌活性降低[73]。随着革兰阴性菌中多种 β-内酰胺酶的出现，克拉维酸复合制剂中抑制剂克拉维酸的浓度对严重感染可能已不足以有效。

在美国，临床上使用的口服克拉维酸和阿莫西林复合制剂的剂量比为 1∶2、1∶4、1∶7 和 1∶16。在北美洲以外的其他地区，也有克拉维酸和阿莫西林注射剂的剂量比为 1∶5 和 1∶10。当阿莫西林与克拉维酸联合用药时，其药理学参数并没有明显改变。阿莫西林-克拉维酸能在胃肠道很好地吸收，两者血清半衰期均为 1 h。该复合制剂 1/3 的剂量被代谢，剩下的以原形随尿排出。该药物在机体的组织和体液中分布广泛，但它不能透过正常的血脑屏障。除了腹泻之外，其他不良反应和阿莫西林单独使用时类似。服用阿莫西林-克拉维酸的患者有 5%～10% 会出现恶心、呕吐、腹部绞痛或腹泻。皮肤过敏反应的发生率与单独使用阿莫西林时类似。

2. 舒巴坦 舒巴坦(sulbactam)是一个半合成的 6-青霉烷砜，只有微弱的抗菌活性[74]。它能抑制金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、许多肠杆菌科细菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌、奈瑟菌属、军团菌属、脆弱拟杆菌组的某些细菌、普雷沃菌属、卟啉单胞菌属和分枝杆菌属(*Mycobacterium* spp.)产生的某些质粒介导的或染色体介导的 β-内酰胺酶[75]。舒巴坦的抑制效果比克拉维酸弱[76]。单独使用舒巴坦，对淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、洋葱伯克霍尔德菌[75,77]和某些不动杆菌属[78]有抗菌活性。在抑制那些对 β-内酰胺类药物耐药的产 β-内酰胺酶细菌时，舒巴坦与青霉素及头孢菌素有协同作用。舒巴坦(8 μg/ml)和氨苄西林(16 μg/ml)联合应用能抑制许多氨苄西林耐药菌，包括大多数葡萄球菌分离株及克雷伯菌属、大肠埃希菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌、奈瑟菌属、脆弱拟杆菌组、普雷沃菌属和卟啉单胞菌属中的许多细菌[79-80]。和克拉维酸一样，舒巴坦不能抑制肠杆菌属、枸橼酸杆菌属、普罗维登菌属(*Providencia* spp.)、吲哚阳性的变形杆菌菌株、假单胞菌属或嗜麦芽窄食单胞菌产生的碳青霉烯酶。

临床上，舒巴坦和氨苄西林以 1∶2 的比例作为注射制剂联合使用。该联合制剂中，这两种药物的药理学特性互不干扰。氨苄西林-舒巴坦复合制剂能很好地分布于机体组织和体液中，包括腹腔液和水疱液中。在脑膜发生炎症时，它能进入脑脊液。和氨苄西林一样，舒巴坦在血清中的半衰期为 1 h，85% 的药物不经过代谢而直接从肾排出。舒巴坦和氨苄西林的清除都受患者肾功能受损的影响，因此，两者的剂量调整策略相似。

氨苄西林-舒巴坦复合制剂最常见的不良反应是恶心、腹泻和皮疹，一过性的嗜酸性粒细胞增多和转氨酶水平增高也有报道。在氨苄西林-舒巴坦的使用过程中也可能发生与氨苄西林相同的不良反应。

3. 他唑巴坦 他唑巴坦(tazobactam)是一个青霉烷酸砜衍生物，结构上与舒巴坦相似。与克拉维酸和舒巴坦一样，他唑巴坦是一个自杀式 β-内酰胺酶抑制剂[75]。其活性和克拉维酸相当，比舒巴坦的效力更高，虽然它本身没有抗菌活性，但当它与 β-内酰胺类抗生素联合用于抑制产 β-内酰胺酶的细菌时，可使 MICs 降低至原来的 1/20[76]。他唑巴坦能抑制葡萄球菌、流感嗜血杆菌、淋病奈瑟菌、脆弱拟杆菌组、普雷沃菌属和卟啉单胞菌属产生的 β-内酰胺酶[76,81-82]。它也能部分抑制不动杆菌属、枸橼酸杆菌属、变形杆菌属、普罗威登斯菌属和摩根菌属产生的 1 组 β-内酰胺酶[75-76,83]。与克拉维酸一样，他唑巴坦在体外能抑制许多产 ESBLs

的肠杆菌科，尤其是大肠埃希菌、克雷伯菌属和奇异变形杆菌（*P. mirabilis*）[76]。在青霉素-β-内酰胺酶抑制剂复合制剂中，哌拉西林-他唑巴坦是对产β-内酰胺酶的需氧和厌氧革兰阴性菌最有效的抗菌药物，可使MICs降低1/8～1/2[76,84]。

他唑巴坦与哌拉西林以1∶8的比例制成的复合制剂需注射给药，两者互不影响对方的代谢及药代动力学，它们在肠黏膜、肺和皮肤均可呈高浓度，而在肌肉、脂肪、前列腺和血脑屏障正常时的脑脊液中分布浓度较低。他唑巴坦的血清半衰期为1 h，主要通过肾排出，肝衰竭不影响其排出[85]。哌拉西林-他唑巴坦复合制剂的主要不良反应与哌拉西林单独使用时类似，如腹泻、皮疹和过敏反应。大约10％的患者可能会出现血清转氨酶水平轻度升高。

他唑巴坦与头孢拉唑以1∶2比例制成的复合制剂已被批准用于治疗腹腔内感染及复杂尿路感染[86]。在头孢拉唑中加入他唑巴坦提高了头孢拉唑抑制产特异2组广谱β-内酰胺酶细菌的活性，包括常常由大肠埃希菌产生的CTX-M-14和CTX-M-15 ESBLs。与哌拉西林-他唑巴坦中他唑巴坦的剂量比较，头孢拉唑-他唑巴坦中他唑巴坦的剂量更高，这可以增强该制剂抑制许多产ApmC细菌的活性，如肠杆菌属。但对头孢他啶耐药的肠杆菌属而言，该复合制剂仍然比头孢吡肟活性低[89]。

4. 阿维巴坦 阿维巴坦（avibactam）是一个新的二氮杂双环辛烷非β-内酰胺酶抑制剂，它能抑制A类和C类β-内酰胺酶，以及某些D类酶[88]。阿维巴坦通过形成可逆的共价氨基甲酰键，从而抑制这些β-内酰胺酶的活性[89-90]。阿维巴坦最近被批准与头孢他啶联合治疗复杂腹腔内感染及复杂尿路感染，阿维巴坦与头孢洛林或氨曲南的复合制剂治疗院内革兰阴性菌感染的疗效也正在研究之中。当阿维巴坦以4 μg/ml的浓度与头孢他啶联合用药抑制肠杆菌科时，阿维巴坦使头孢菌素抑制所有细菌的活性增加4～8000倍，使MICs≤4.0 μg/ml，甚至包括那些产AmpC β-内酰胺酶，TEM、SHV或CTX-M型ESBL，以及KPC和OXA-48碳青霉烯酶的细菌[88]。阿维巴坦不能增强头孢菌素对产生如产NDM、IMP和VIM等金属β-内酰胺酶的细菌的活性[88]，但与氨曲南联合使用时对许多产MBLs菌株有效，氨曲南不会被这些酶水解[91-92]。

5. 瓦博巴坦 瓦博巴坦（vaborbactam）是一种新型的环硼酸抑制剂，可抑制多种A类β-内酰胺酶，包括丝氨酸碳青霉烯酶[93]。这种抑制剂与美罗培南联合使用主要针对可以产生KPC的肠杆菌科细菌，当瓦博巴坦的浓度为8 μg /ml时，大于98％的上述菌株对美罗培南的MIC≤1 μg/ml。这种联合用药用于治疗由对碳青霉烯类抗生素耐药细菌引起的严重感染仍处于临床试验的研究阶段（www. clinical trials. gov/ct2/show/NCT02168946），已被批准用于治疗包括肾盂肾炎在内的复杂尿路感染[94]。

6. 雷巴坦 雷巴坦（relebactam）是一种新型的二氮杂二环辛烷β-内酰胺酶抑制剂，它与亚胺培南-西司他丁的复合制剂正在研发中[95]。在亚胺培南中加入雷巴坦，可以保护亚胺培南不被A类碳青霉烯酶（如KPC）和高产AmpC头孢菌素酶水解，从而恢复亚胺培南对许多革兰阴性菌多重耐药细菌的抗菌活性[96]。雷巴坦不能抑制NDM、IMP或VIM家族的B组金属β-内酰胺酶，其对OXA型D组β-内酰胺酶的抑制力变化不定。这一组合已经完成了治疗腹腔内感染及复杂尿路感染的Ⅱ期临床试验，并且正在Ⅲ期临床使用中研究治疗对亚胺培南耐药的感染和细菌性肺炎[97]。

四、喹诺酮类

喹诺酮（quinolone）类抗菌药物是一类生物化学性质与萘啶酸相关的有效抗菌药物，萘啶酸最初是用于治疗尿路感染的药物。较新的喹诺酮类抗菌药物是通过用不同侧链取代基修饰原始的双环-4-喹诺酮（或萘啶酮）核而合成[98]。所有这些新合成的药物，如众所周知的氟喹诺酮类抗菌药物，都包含一个连接在6号位置上的氟原子。目前，在美国上市用于临床的喹诺酮类抗菌药物见表70-3。格帕沙星、替马沙星和曲伐沙星由于其毒性，已经退出了临床应用。而司帕沙星、洛美沙星和加替沙星在美国已经不再用于全身给药。但是，加替沙星和贝西沙星被批准可用于眼部。德拉沙星最近在美国被批准用于AB-SSSI，并且，目前正在进行用于CABP的Ⅲ期临床试验。

表 70-3　喹诺酮类抗菌药物

窄谱类
萘啶酸[a]
广谱类
环丙沙星
左氧氟沙星　诺氟沙星
氧氟沙星
培氟沙星[b]
贝西沙星[c]
加替沙星[c]
吉米沙星
莫西沙星
德拉沙星

注：[a] 在美国已停止临床使用；[b] 在美国未获准临床使用；[c] 仅限局部使用

(一)作用机制

喹诺酮类抗菌药主要的细菌靶点是 DNA 促旋酶，它是一种Ⅱ型 DNA 拓扑异构酶，是 DNA 复制、重组和修复必不可少的酶[99]。较新的氟喹诺酮类也能抑制 RNA 拓扑异构酶Ⅳ。DNA 促旋酶 A 亚单位是喹诺酮类对革兰阴性细菌的主要靶点，而拓扑异构酶Ⅳ是革兰阳性菌的主要靶点。对这些细菌酶靶点的抑制可引起 DNA 超螺旋的松弛和断开，从而导致染色体复制的终止，干扰细胞分裂及基因表达。这些药物通过抑制细菌 DNA 的合成而达到杀菌的效果。但是，喹诺酮类的杀菌效果在低 pH、尿素和二价阳离子(Mg^{2+}、Ca^{2+})存在时可减弱。

细菌对喹诺酮类抗菌药物耐药可能有以下几种机制：①编码 DNA 促旋酶和拓扑异构酶Ⅳ的结构基因(*gyrA*、*gyrB*、*parC* 和 *parE*)染色体单步突变。②控制细胞外壁对药物通透性的调节基因突变。③表达或过表达能量依赖性多药物排出泵 AcrAB。④获得质粒介导的耐药基因(*qnrA*、*qnrB* 和 *qnrS*)，其编码蛋白能够阻止喹诺酮类抗菌药物与 DNA 促旋酶和拓扑异构酶Ⅳ的结合。⑤获得携带耐药基因 *aac*(6′)-*Ib-cr* 的质粒，它能编码多种氨基糖苷乙酰转移酶，该酶能乙酰化喹诺酮类抗菌药物哌嗪取代基上的氨基氮，从而降低它们的活性。细菌对环丙沙星和诺氟沙星耐药是这一机制导致的，但左氧氟沙星不是。后两个机制可导致细菌对喹诺酮类低水平耐药[100-101]。

(二)药理学

除诺氟沙星外，氟喹诺酮类抗菌药物在胃肠道一般能被很好地吸收。不同的氟喹诺酮，其口服生物利用度为 58%～95%[102]。在广泛使用的氟喹诺酮类药物中，德拉沙星的口服生物利用度最低，为 58%[103]。口服给药后，血药浓度在 1～2 h 内达到峰值，胃肠道是否存在食物不会显著改变这些药物的吸收率。但喹诺酮类与含铁或锌的复合维生素或含铝、镁或钙的抗酸制剂共同服用时，能显著减少其胃肠吸收率和最终的血药浓度峰值。氟喹诺酮的血浆蛋白结合率一般较低，从氧氟沙星的 8% 到莫西沙星的 54% 不等。德拉沙星是该类药物中的一个例外，84%的药物可与血浆蛋白结合。氟喹诺酮类抗生素的清除半衰期较长，故可以每天 1 次或 2 次给药[104-105]。环丙沙星、左氧氟沙星和莫西沙星也可以静脉给药，而贝西沙星、环丙沙星、加替沙星、左氧氟沙星、莫西沙星和氧氟沙星有在售的眼用制剂。

喹诺酮类抗菌药物在肺、肾、肌肉、骨、肠壁和血管外液中都有很好的渗透能力。前列腺中的药物浓度大约是血浆中的 2 倍，尿中的浓度是血浆峰浓度的 25～100 倍。与左氧氟沙星和环丙沙星比较，莫西沙星从尿中排出量显著减少，不推荐其用于尿路感染的治疗。虽然高剂量的环丙沙星(400 mg，静脉注射，每 8 h 一次)已经成功用于革兰阴性菌引起的脑膜炎的治疗，但在脑膜有炎症时，只有氧氟沙星、左氧氟沙星、加替沙星和莫西沙星能在脑脊液中达到>1 μg/ml 的浓度[106-107]。喹诺酮类抗菌药物能够很好地渗透进入吞噬细胞，因此，在中性粒细胞和巨噬细胞中的浓度高达血浆浓度的 14 倍[108]。该特性使它们在体内对胞内病原菌，如布鲁菌属(*Brucella* spp.)、李斯特菌属(*Listeria* spp.)、沙门菌属和分枝杆菌属等有很好的抗菌作用。

氧氟沙星和左氧氟沙星在体内几乎不被代谢，主要通过肾排出(90%)。其他的喹诺酮类抗菌药以不同的比例通过肝和肾清除，其中主要是通过肾。通过肾排出可以被丙磺舒抑制。这些药物也有少量通过胆汁排出。

其他氟喹诺酮类抗生素在肾衰竭时清除率显著下降。由于显著的血管外渗透性，所有这类药物只能被血液透析部分清除(<15%)，腹膜透析

的作用甚小，可见它们的分布容积很大。

(三)抗菌谱

喹诺酮类抗菌药可以通过相似的抗菌谱来分群(表70-3)，氟喹诺酮类抗菌药物呈现出广谱抗菌活性[98]。窄谱喹诺酮类抗菌药物的主要代表药物为萘啶酸，它对革兰阳性球菌无效，其主要临床应用仅限于耐药细菌的大范围流行及快速出现时。广谱氟喹诺酮类抗菌药物对革兰阳性和阴性细菌均有抗菌活性[109]。新型氟喹诺酮类抗菌药物的主要特征是抗革兰阳性球菌的活性增强及具有良好的药代动力学性质(0～24 h曲线下面积与MIC比值较高)。如吉米沙星，其活性比早期的药物提高了2～8倍[109-110]。喹诺酮类抗菌药物对敏感葡萄球菌的MICs从0.03～1 μg/ml不等，但许多耐甲氧西林葡萄球菌对这些药物仍然耐药[111]。值得注意的是，对于许多耐其他氟喹诺酮的MRSA菌株，德拉沙星似乎有一定的抗菌活性，对耐左氧氟沙星的金黄色葡萄球菌菌株，其MIC_{90}为0.25 μg/ml[112]。尽管吉米沙星和莫西沙星抑制肠球菌的活性低于葡萄球菌，但它们抑制多重耐药肺炎链球菌的效能仍然比左氧氟沙星高4～8倍(其MIC_{90}s为0.03～0.25 μg/ml)。德拉沙星对肺炎链球菌表现出高度的抗菌活性，MIC_{90}为0.015 μg/ml[113]。

德拉沙星最近被FDA批准用于静脉和口服治疗包括MRSA(MIC_{90}=0.12 μg/ml)在内的敏感菌引起的ABSSSI，并且，目前正在进行对于CABP的Ⅲ期临床试验[114]。目前，这些药物正在进行CABP治疗的Ⅲ期临床试验。它们对肠道革兰阴性细菌的抗菌活性可能与环丙沙星类似，而它们抗铜绿假单胞菌的活性可能略高于环丙沙星[115]。然而，在由铜绿假单胞菌引起的ABSSSI的情况下，应谨慎使用德拉沙星，因为对于铜绿假单胞菌，其血清抗菌药物浓度时间曲线的面积和MIC的比值(fAUC/ MIC)较低，导致该药物与蛋白的结合率相对较高。德拉沙星作为单剂量口服制剂治疗淋病的Ⅲ期临床试验已经失败，因此不适用于此适应证。

目前，能全身给药的喹诺酮类抗菌药物中，只有莫西沙星在浓度为0.06～2.00 μg/ml时，才对厌氧菌具有临床有效的活性，这些厌氧菌包括普雷沃菌属、卟啉单胞菌属、梭杆菌属、梭菌属和厌氧革兰阳性球菌[116]。然而，拟杆菌属的细菌对莫西沙星的耐药常见，在拟杆菌属感染时，应谨慎使用该药，或者，应先确定该菌是否对莫西沙星敏感[18,116]。

对于敏感的肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌、枸橼酸杆菌属、沙雷菌属、不动杆菌属、流感嗜血杆菌和革兰阴性球菌，如淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌和卡他莫拉菌，氟喹诺酮类抗菌药物在体内呈现出非常有效的抗菌活性[110]。但是，在近十年间，细菌耐药的出现使得这些药物在应用于严重感染时，其效果被显著削弱。由于通常对氟喹诺酮耐药的多重耐药大肠埃希菌ST131的出现，大肠埃希菌对氟喹诺酮的耐药已经成为一个严峻的挑战[117-118]。美国许多医疗中心报道，大肠埃希菌分离株中环丙沙星的耐药率超过25%。肠道致病的革兰阴性细菌，如沙门菌属、志贺菌属、小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)、弧菌属(*Vibrio* spp.)、气单胞菌属(*Aeromonas* spp.)、邻单胞菌属(*Plesiomonas* spp.)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)、肠侵袭性和肠毒素性的大肠埃希菌，它们对喹诺酮类抗菌药物非常敏感[111]。临床研究显示，这些药物对感染性腹泻的预防和治疗非常有效。但在沙门菌属、志贺菌属和弯曲菌属中已经出现对喹诺酮类敏感性降低和耐药的临床分离株[119]。军团菌属对这些药物敏感，大部分氟喹诺酮类对这些细菌的MICs为0.12～1.00 μg/ml[109]。环丙沙星、左氧氟沙星和德拉沙星是临床上治疗非尿路感染铜绿假单胞菌唯一的口服抗菌药物，环丙沙星和德拉沙星在体外表现出同样的抗菌活性；然而，如上文所述，德拉沙星较高的蛋白结合率表明，德拉沙星可能不是治疗非ABSSSI的最佳药物。环丙沙星比左氧氟沙星对铜绿假单胞菌的抗菌活性更强，其MIC_{90}s为0.5～1.0 μg/ml，但是在许多地区，其耐药率非常高。伯克霍尔德菌属和嗜麦芽窄食单胞菌对喹诺酮类的耐药率呈多样性，虽然嗜麦芽窄食单胞菌通常也能被环丙沙星抑制[120]。

氟喹诺酮类抗菌药物，尤其是左氧氟沙星、加替沙星、德拉沙星和莫西沙星，在体外对结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)、偶发分枝杆菌(*M. fortuitum*)、龟分枝杆菌(*M. chelonae*)、堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*)和蟾分枝杆菌(*M. xenopi*)有抗菌活性[121-123]。莫西沙星联合其他抗结核药用于敏感结核

菌短程治疗的研究正在进行最后阶段的临床试验(http://www.tballiance.org/portfolio/node/53)。莫西沙星是对鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)复合群最有效的氟喹诺酮类药物,该分类下的其他药物则几乎无活性[124]。氟喹诺酮类对沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*)和人型支原体(*Mycoplasma hominis*)也有抗菌活性,其 MIC_{90}s 从 0.1~1.0 μg/ml 不等,但它们对解脲脲原体(*Ureaplasma urealyticum*)抗菌效能较低[111,125]。氟喹诺酮类能抑制康诺尔立克次体(*Rickettsia conorii*)、立氏立克次体(*Rickettsia rickettsii*)和贝纳特柯克斯体(*Coxiella burnetii*)[126-128]及巴尔通体属(*Bartonella* spp.)[129]和马耳他布鲁菌(*Brucella melitensis*)[130]。虽然在体外研究中喹诺酮类在可达到的血药浓度时可呈现抑制恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)的活性,但用于临床治疗疟疾时,它们效果不佳。尽管与较早期的药物相比,莫西沙星和加替沙星的抗菌活性有了显著的提高,但诺卡菌属(*Nocardia* spp.)对喹诺酮类仍有一定的耐药性[131-132]。

在对喹诺酮类敏感的细菌中,没有发现显著的接种效应。喹诺酮类和β-内酰胺类或氨基糖苷类的联合应用在抗革兰阴性菌、革兰阳性菌及分枝杆菌方面通常都呈现出无关或相加作用[133]。但是,喹诺酮类的杀菌作用可以被利福平或氯霉素拮抗。

(四)不良反应

胃肠道症状是最常见的不良反应,发生率高达 10%,如恶心、呕吐、腹部不适和腹泻[134]。越来越多的艰难梭菌(*C. difficile*)引起的肠炎与氟喹诺酮类的使用相关,尤其是较新的喹诺酮类药物[135]。为了强调氟喹诺酮类药物对神经系统和肌腱相关的副作用,所有全身用药的氟喹诺酮类药物的用药说明书最近已更新并以黑框警告。神经系统的不良反应通常与老年患者大剂量用药或者与非甾体抗炎药物同时使用有关。

过敏反应并不常见,通常以皮疹、荨麻疹和泛发性瘙痒症的形式出现。光敏性(皮炎)极少发生,但可以在氟喹诺酮全身用药时出现。在氟喹诺酮的使用过程中,实验室检查异常,如血清转氨酶水平升高、嗜酸性粒细胞增多、白细胞减少及血小板减少等极少发生。由于会出现低血糖或高血糖的后遗症,全身给药的加替沙星已经退出美国市场。

环丙沙星可以增加血清中茶碱和咖啡因的水平,从而导致肝清除率降低[136]。其他已报道的药物相互作用包括环丙沙星能增强华法林的抗凝效果,并提高血清环孢霉素的水平[136]。虽然在动物实验评估喹诺酮的毒性时出现过不可逆的软骨糜烂和骨骼异常[133],但这些不良反应还没发生在人类身上。通常认为喹诺酮类不宜用于儿童、妊娠或哺乳期妇女,但最近已经完成的几个用氟喹诺酮治疗儿童中耳炎的病例显示,不良事件的发生与对照药物并无差异[137-138]。就像其用药说明书中所提醒的一样,喹诺酮类的全身用药可能增加所有年龄组患者肌腱炎和肌腱断裂的风险,而这种风险似乎和年龄及皮质激素的联合使用呈正相关。另外,氟喹诺酮类有加剧重症肌无力患者的肌无力症状的风险[139]。在美国,所有氟喹诺酮类全身用药者(除了德拉沙星)会被提醒可能会发生 QT 间期延长及尖端扭转型室性心动过速。这些病例并不常见,通常发生在有心功能不全病史、血清电解质紊乱及肾功能受损的患者。

五、氨基糖苷类和氨基环醇类

自从 1944 年首个氨基糖苷(aminoglycoside)类氨基糖苷化的氨基环醇(aminoglycosidic aminocyclitol)药物——链霉素出现,该类抗菌药物在革兰阴性菌感染的治疗上发挥了重要作用。氨基糖苷类的特性主要是抑制需氧革兰阴性杆菌(包括假单胞菌属)和结核分枝杆菌,而且这些菌株对其耐药的发生率相对低。现在的氨基糖苷类(卡那霉素、新霉素、链霉素和妥布霉素)是从小单孢菌属(*Micromonospora* spp.)或链霉菌属(*Streptomyces* spp.)中提取出来的。链霉素、新霉素、卡那霉素、妥布霉素和庆大霉素为天然的氨基糖苷类,阿米卡星则为卡那霉素的半合成衍生物。每个氨基糖苷类药物在结构上都有 2 个或多个氨基糖通过糖苷键连接到氨基环醇核上。Plazomicin 是一种新的氨基糖苷类药物,来源于西索米星,最近完成了治疗 cUTI Ⅲ期临床试验和对碳青霉烯类耐药肠杆菌科的最佳治疗方案的研究。该化合物的优势在于它能够抵抗肠杆菌科常见的

氨基糖苷类耐药机制，但含甲基化酶基因的细菌除外，这些细菌中甲基化酶基因可以产生 MBLs 中的NDM[140]。

(一)作用机制

氨基糖苷类是杀菌剂，通过不可逆地结合到细菌 30S 核糖体亚单位上，从而抑制细菌的蛋白质合成。氨基糖苷结合的细菌核糖体由于无法在蛋白质的合成过程中翻译 mRNA 从而导致了细菌死亡[141]。同时，氨基糖苷类可以导致遗传密码的错误阅读而合成错误的蛋白。为了能与细胞内的靶点核糖体结合，氨基糖苷类需要通过一个有氧的能量依赖性过程以成功穿透细胞内膜。该步骤需要有氧环境，因此，氨基糖苷类对厌氧菌无效。细菌细胞壁合成的抑制剂，如 β-内酰胺类和万古霉素，有益于细菌对氨基糖苷类的摄取。氨基糖苷类和 β-内酰胺类的这种相互作用是两者发挥协同作用的基础。细菌对氨基糖苷类的 3 种已知耐药机制：①由于细胞外膜通透性改变、内膜转运减少或外排泵的激活，进入细菌内的抗生素的量下降。②核糖体蛋白或 16S RNA 突变，或者 16S RNA 转录后的甲基化使氨基糖苷类作用的靶点发生了改变[142]。③药物发生了酶学修饰，这是最常见的耐药机制[143]。

(二)药理学

氨基糖苷类药物的药理特性相仿。它们的胃肠道吸收率难以预测且通常很低。由于新霉素全身用药的毒性很强，故只能用于口服或局部用药。静脉用药后，氨基糖苷类主要分布于细胞外间隙，但即使是在炎症时，也难以进入脑脊液、眼玻璃体液、胆道、前列腺和气管支气管分泌物。

对于肾功能正常的成人，氨基糖苷类的半衰期为 2～3 h。氨基糖苷类主要以原型经肾脏排泄，不同个体间氨基糖苷类的排出方式明显有差异，特别是对于那些肾功能受损的患者需要更加谨慎。当对这些患者给药时，为获得足够的治疗剂量而又降低药物毒性，监测血清中氨基糖苷类的药物浓度是非常必要的。由于氨基糖苷类的浓度依赖性杀菌特征和较长的抗菌药物后效应，它可以每天给药 1 次并在血浆高浓度时达到最大杀菌效应而不会增加毒性[138]。当肾功能不全时，有必要减少给药剂量并延长给药间隔。氨基糖苷类药物主要是通过血液透析清除，通过腹膜透析清除的程度较低。

(三)抗菌谱

氨基糖苷类主要作用于需氧革兰阴性杆菌和金黄色葡萄球菌，而且，特别是对肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌和不动杆菌属有效。不同的氨基糖苷类药物的抗菌谱存在区别。由于肠杆菌科细菌的广泛耐药，链霉素已不适用于其感染的治疗。链霉素作为联合用药的一部分，被广泛应用于抗结核分枝杆菌的治疗中(它是氨基糖苷类中最有效的抗结核药)，亦用于治疗对庆大霉素高水平耐药而对链霉素高水平敏感肠球菌的感染[145]。链霉素单药还可用于土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)引起的感染(兔热病)和鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)引起的感染(鼠疫)[146]。链霉素曾与四环素联合用于布鲁菌病，但由于难以检测其血清中的药物浓度而被庆大霉素所代替。

虽然庆大霉素和妥布霉素的抗菌谱相似，但体外抗菌活性显示庆大霉素对沙雷菌属抗菌活性更强，妥布霉素则对铜绿假单胞菌更强[147]，但这一细微的差别并不能说明两种药物的药效哪个更好一些。多数情况下，庆大霉素和妥布霉素可被耐药细菌产生的相同修饰酶灭活。但相对于庆大霉素，妥布霉素还能被 6-乙酰转移酶和 4′-腺苷转移酶灭活，而对 3-乙酰转移酶的敏感性变化不定。阿米卡星能够耐受多种氨基糖苷类的修饰酶，因此，其适用于对庆大霉素和妥布霉素耐药的许多肠杆菌科细菌[148]。当庆大霉素和妥布霉素耐药菌株流行时，通常选用阿米卡星。同时，阿米卡星也适用于很多对其敏感的分枝杆菌属感染的治疗[149]。除了产生核糖体甲基化酶的菌株，Plazomicin 对目前几乎所有能产生氨基糖苷类修饰酶的细菌具有抗菌活性，可以抑制许多对庆大霉素、妥布霉素和阿米卡星耐药的肠杆菌科细菌[150]。Plazomicin 对阿米卡星耐药的不动杆菌几乎没有抑制作用，而由于 Plazomicin 对铜绿假单胞菌的 MICs 较高，其对铜绿假单胞菌没有明显的抑制作用[151]。氨基糖苷类对于嗜血杆菌属和奈瑟菌属轻度有效。在所有针对鲍特菌属(*Bartonella* spp.)的药物中，氨基糖苷类是唯一对其有稳定杀菌作用的药物[146]。

虽然氨基糖苷类药物对葡萄球菌有效，但并

不推荐它单独用于葡萄球菌感染的治疗。庆大霉素通常与青霉素或万古霉素联合用于治疗葡萄球菌、肠球菌或草绿色链球菌群引起的重症感染[145]。但是,这种联合治疗不能用于金黄色葡萄球菌和肠球菌引起的自体瓣膜心内膜炎,因为即使是短期用药也可能造成毒副作用[145]。氨基糖苷类对于厌氧菌无效。

大观霉素曾主要用于对青霉素或头孢菌素过敏的淋病奈瑟菌感染的患者和对喹诺酮类存在禁忌证的患者的治疗,但它目前已不用于美国的临床治疗[21]。大观霉素对于淋球菌感染引起的咽炎、梅毒和衣原体感染无效。

(四)不良反应

所有氨基糖苷类都有其固有的毒性,主要表现为肾毒性、耳毒性或前庭毒性。不同的氨基糖苷类药物对肾损害程度不同,其中,新霉素最大而链霉素最小。不良反应通常在停药后可逆转。低血压、治疗时间的延长、肾功能不全和血浆氨基糖苷浓度过高都可能增强氨基糖苷类药物对肾的损害。所有的氨基糖苷类药物都可以导致第Ⅷ对脑神经损害。前庭功能失调多发生于妥布霉素、链霉素和庆大霉素,而耳毒性多发生于阿米卡星和卡那霉素。这些不良反应即使在停药后也是不可逆的,并且,在再次用药时会有累积效应。耳毒性与选择性损害耳蜗的毛细胞有关。临床资料证实,在使用庆大霉素、妥布霉素或阿米卡星的患者中,有 3%~5% 的病例出现听力障碍和前庭功能失调[152]。

神经肌肉麻痹可发生于快速静脉给予氨基糖苷类药物之后,但这通常可逆。这种情况可见于处置重症肌无力或麻醉过程中使用琥珀酰胆碱时。其他轻微的不良反应包括局部疼痛和皮肤过敏。大观霉素不会导致严重的不良反应。

六、大环内酯类

大环内酯(macrolide)类于 20 世纪 50 年代开始应用,其原型药红霉素已经使用了 30 余年[153]。它的化学结构中包含一个大环内酯环结构,环上链接有 2 个糖基,去氧糖胺和二脱氧甲基已糖。这类药物间的不同在于酯环的大小不同(14~16 个原子)和环上的取代基不同。红霉素是红霉素链霉菌(*Streptomyces erythreus*)产生的天然大环内酯类,其他天然的类似药物包括竹桃霉素、螺旋霉素和交沙霉素。克拉霉素是一种半合成的十四元环大环内酯类,而阿奇霉素是一个十五元环的衍生物,又称作氮杂内酯(azalide),是由一个氮原子插入到内酯环中而形成。这些新的大环内酯类较红霉素有许多显著的优点,它们有更广的抗菌谱、更优良的药代动力学参数、更少的不良反应发生率和药物交叉反应。

(一)作用机制

大环内酯类是一种常用的抑菌剂,它抑制细菌 RNA 依赖性蛋白的合成,在高浓度和细菌数量少时可成为一种杀菌剂。大环内酯类能可逆性地结合于敏感细菌 50S 核糖体亚基的 23S rRNA 上,从而阻止肽链延长时的易位反应[154]。*ermB* 基因编码的 rRNA 甲基转移酶可以修饰 23S rRNA 靶结合位点,这是大环内酯类主要的耐药机制之一,其赋予大环内酯类、林可酰胺类和链阳菌素 B(macrolide-lincosamide-streptogramin B, MLS_B)共同的耐药性[155-156]。*erm* 的表达可以是结构性或诱导性的。如果是诱导性的,则菌株表现出对红霉素耐药而对克林霉素敏感。但是,克林霉素的治疗可能导致选择性的耐药突变而使治疗失败[155]。大环内酯类其他不常见的耐药机制包括大环内酯类灭活酶的生成(酯酶、磷酸化酶和糖苷酶),*mef* 和 *msr* 编码的药物外排泵,*mtrR* 启动基因突变诱导 *mrtrCDE* 编码的外排泵的过度产生和 23S rRNA 的突变[156-157]。

(二)药理学

红霉素的给药途径有多种,如局部、胃肠外(乳糖酸盐)和口服(硬脂酸盐、乙基琥珀酸盐和丙酸酯十二烷基硫酸盐)用药。但克拉霉素只能用于口服,阿奇霉素可以口服和静脉给药。当红霉素口服时,胃酸会立即灭活红霉素碱,但新一代大环内酯类可抵抗酸降解。在肠道有食物残渣时,红霉素(除了丙酸酯十二烷基硫酸盐的形式)和阿奇霉素的肠道吸收可以减低到 50%。口服 500 mg 红霉素、250 mg 克拉霉素和 500 mg 阿奇霉素 3 h 后达到的血清峰值分别为 2~3 μg/ml、1~2 μg/ml 和 0.4 μg/ml。静脉注射红霉素和阿奇霉素的血药浓度可以更高。大环

内酯类的组织分布好，其浓度可达血清的10～100倍[158]。高浓度药物可快速到达中性粒细胞和巨噬细胞内以杀伤胞内微生物[159]。尽管它们难以渗透入脑组织和脑脊液，但可透过胎盘，也可通过乳汁分泌。

红霉素和克拉霉素主要在肝代谢并主要由胆道排出。阿奇霉素也主要随胆汁排出。克拉霉素呈现首过代谢效应，产生具有微生物活性的14-羟基衍生物，较母体药物的杀菌作用高出2～4倍。红霉素、克拉霉素、14-羟基克拉霉素和阿奇霉素在血清中的末端半衰期分别为1.5、5、8.5和41 h。由于阿奇霉素的组织穿透能力强，它在组织中的半衰期可达到2～4天[159]。对于中重度肾功能不全(肌酐清除率<30 ml/min)的患者，给予克拉霉素时需调整剂量。除了克拉霉素，其他大环内酯类很少可通过血液透析和腹膜透析清除。

(三)抗菌谱

大环内酯类是相对广谱抗菌药物，对革兰阳性菌和部分革兰阴性菌，以及支原体、衣原体、密螺旋体和立克次体有效[158-159]。红霉素主要作用于葡萄球菌和包括肺炎链球菌在内的链球菌，但是这些菌的耐药株正日益增多[3-5,160]。对葡萄球菌和链球菌，克拉霉素比其他大环内酯类的抗菌作用强2～4倍，而阿奇霉素比红霉素的药效要弱[161]。这些药物对链球菌敏感株有杀菌作用，但对其他微生物则仅有抑菌作用。红霉素耐药株可对克拉霉素和阿奇霉素交叉耐药。绝大多数耐甲氧西林的葡萄球菌和许多肠球菌对大环内酯类耐药。这些药物也可作用于棒状杆菌属(*Corynebacterium* spp.)、李斯特菌和衣氏放线菌(*Actinomyces israelii*)[161]。

大环内酯类对革兰阴性杆菌的杀菌活性可受pH影响，当pH升高至8.5时杀菌活性增强(较低的MICs)。相对于其他大环内酯类，流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌对阿奇霉素更敏感(MIC_{90}=0.5 μg/ml)，前者的MIC_{90}s较后者高8～16倍[162-163]。但是，克拉霉素与其14-羟基代谢物的相加效应(可能是协同效应)反而使得克拉霉素对流感嗜血杆菌的MIC值降低了1/4～1/2[164]。大环内酯类抗菌药物中，克拉霉素对肺炎衣原体(MIC_{90}=0.25 μg/ml)和军团菌分离株(MIC_{90}=0.25 μg/ml)最有效[165]。这3种大环内酯类药物都可抑制百日咳鲍特菌(*Bordetella pertussis*)和肺炎支原体。尽管新一代大环内酯类具备良好的耐受性、药代动力特性和药物相互作用而广泛应用于临床，红霉素仍然是以上病原菌及军团菌属感染的首选用药。然而，氟喹诺酮类对于军团菌属的抗菌作用可能优于大环内酯类[166]。大环内酯类对弯曲菌属、幽门螺杆菌、多杀巴斯德菌(*P. multocida*)、脑膜炎奈瑟菌和伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)也有抗菌活性[161,163]。不同于其他大环内酯类，即使耐药菌株如今已经常见，阿奇霉素对大肠埃希菌、志贺菌属、沙门菌属和小肠结肠炎耶尔森菌的某些菌株仍有良好的体外杀菌作用[162,167]。

大环内酯类抗菌药物对许多性传播疾病的病原菌具有体外抗菌活性，包括淋病奈瑟菌、杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*)、沙眼衣原体和解脲脲原体。阿奇霉素只作用于人型支原体(*Mycoplasma hominis*)[161-162]。阿奇霉素(单剂量2 g)可用于对头孢曲松严重过敏的淋病患者的治疗[21]。同时，2 g剂量阿奇霉素可作为不能耐受青霉素G和多西环素的早期梅毒患者的三线治疗药物。但也已经发现并报道了一些阿奇霉素耐药菌株[21]。以往认为阿奇霉素可替代四环素类药物用于生殖道衣原体感染的治疗，而现在这一点受到质疑[168]。大环内酯类是鲍特菌属的抑菌药物[129]。大环内酯类对许多厌氧菌有良好的抗菌活性，如放线菌属、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、消化链球菌属(*Peptostrptococcus* spp.)、普雷沃菌属、卟啉单胞菌属和一些厌氧革兰阳性球菌，MIC_{90}s为1～4 μg/ml[169]。它们对拟杆菌属抑菌活性弱，MIC_{90}>32 μg/ml。同样，对具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、无害梭菌(*Clostridium innocuum*)和乳杆菌属(*Lactobacillus* spp.)抗菌活性也弱，大环内酯类对于这些细菌的MIC_{90}s>32 μg/ml。

非典型的分枝杆菌比结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)对大环内酯类药物更敏感。普遍认为克拉霉素是治疗这类细菌感染的金标准药物[149,162]。对鸟分枝杆菌(*M. avium*)复合群，克拉霉素和阿奇霉素的MIC_{90}s在2～4 μg/ml范围内，当这些药物联合其他抗结核药使用时，可对巨噬细胞内的病原菌发挥相加和协同杀菌作用[161]。克拉霉素可用于治疗龟分枝杆菌和其他

一些非结核性分枝杆菌（*Nontuberculous mycobacteria*）的感染[149]。

克拉霉素和阿奇霉素对于刚地弓形虫（*Toxoplasma gondii*）的体外抗菌作用类似，并作为该病原体感染的备选治疗药物[170]。

(四)不良反应

大环内酯类用药相关的严重不良反应发生率相对低。胃肠道刺激症状，如腹部绞痛、恶心、呕吐和腹泻，常见于红霉素的口服给药，也可见于静脉给药。克拉霉素和阿奇霉素不常出现这些不良反应。静脉注射红霉素易引发血栓性静脉炎，所以在临床上静脉给药常选用阿奇霉素代替红霉素。过敏反应可出现如皮疹、发热和嗜酸性粒细胞增多。成人胆汁淤积性肝炎的发生常与依托红霉素（红霉素丙酸酯的十二烷基硫酸盐）的用药有关，但也有与其他形式的红霉素[171]和阿奇霉素[172]用药相关的报道。因此，现已不再推荐依托红霉素用于成年人。

可逆性的耳聋可发生于使用大剂量的红霉素或者血清浓度过高的情况（>4 g/d），通常发生于肾功能不全的老年患者[165]。有报道称大剂量应用克拉霉素和阿奇霉素治疗鸟分枝杆菌复合感染时可出现耳毒性。假膜性结肠炎及念珠菌属（*Candida* spp.）或革兰阴性杆菌引发的胃肠道或阴道二重感染少见。红霉素是细胞色素 P450 酶有效的抑制剂，可导致多种药物之间的相互作用[173]。虽然克拉霉素对细胞色素 P450 的抑制明显不如红霉素，但其仍然是临床上重要的 P450 抑制剂，也可引起临床上值得注意的许多药物相互作用。阿奇霉素对于肝脏酶类的抑制作用小，因而很少在临床上引起药物相互作用。2013 年 3 月，美国 FDA 发布阿奇霉素的药物安全报告，指出其可增加因心律失常而致心源性猝死的风险，警告阿奇霉素的使用可能会导致潜在的致死性心律失常。有心律失常病史、电解质紊乱或同时使用抗心律失常药的患者使用阿奇霉素风险最高。

(五)非达霉素

非达霉素（Fidaxomicin）是一个不可吸收的 18 元环大环内酯类抗生素，美国 FDA 已批准其用于艰难梭菌（*Clostridium difficile*）感染性腹泻的治疗。非达霉素通过抑制 RNA 聚合酶从而阻碍 RNA 链的合成和转录[171]。此药在临床只有片剂，每 12 h 服用 200 mg，在肠道内可达到高的药物浓度而血清浓度低于 10 ng/ml。其主要代谢产物 OP-1118 对艰难梭菌也有活性，其血清药物浓度也较低。非达霉素对艰难梭菌的 MIC_{90} 为 0.5 μg/ml，而粪便中的药物浓度可高达 500 μg/g。非达霉素对脆弱拟杆菌和非梭菌的其他肠道厌氧菌的抗菌活性很低，对脆弱拟杆菌、普雷沃菌属、真杆菌属、兼性革兰阴性杆菌、多枝梭菌（*Clostridium ramosum*）及其他肠道厌氧菌，其 MICs 通常在 256～1024 μg/ml[175]。通过连续传代，艰难梭菌的 *rpoB* 和（或）*rpoC* 基因发生基因改变，这导致非达霉素的 MICs 升高，临床上也曾报道过一例此现象，但非达霉素的 MICs 仍然比其在粪便中的浓度低 100 倍，因此，其在临床中的意义还有待明确[176]。

在临床探索艰难梭菌的治疗中，比较于每 6 h 给 125 mg 万古霉素，每 12 h 给予 200 mg 非达霉素的疗效并无劣势。而使用非达霉素的患者复发率降低了 10%～15%。非达霉素比万古霉素在复发率上的优势主要与肠道正常菌群的保持有关[177]。虽然由于复发率低而使非达霉素比万古霉素有更多的治疗优势，但该药价格昂贵，临床应用难以推广。

七、酮内酯类

酮内酯（Ketolide）类为红霉素 A 的半合成衍生物，其在红霉内酯 A 环 3 位上以一个酮基取代了 L-二脱氧甲基己糖，化学结构的改变增强了其在弱酸环境中的稳定性、MLS_B 耐药的不可诱导性和对革兰阳性球菌的抗菌活性。酮内酯类在临床广泛应用主要缘于其在大环内酯核上的碳原子 11 和 12 之间构建氨基甲酸酯链接，这种结构变化增强了药物对核糖体 A2058 位点已甲基化的细菌的抗菌能力[178]。泰利霉素是现在首个并且仅有的在美国被批准应用于临床的酮内酯类药物，但由于其可能引起的暴发性肝衰竭而在应用上受到了严格的限制，因此，在应用该药时要特别注意肝损伤。另外，对于重症肌无力的患者，泰利霉素可引起呼吸衰竭。赛红霉素是另一个抗菌特性与泰利霉素相似的酮内酯类，目前已完成Ⅲ期临床试验，然而，美国 FDA 认为虽然该药看似安全，但无

足够的研究证明其对轻到中度社区获得性肺炎(community-acquired pneumonia，CAP)有效，因此没有批准该药并且在 2009 年发布了回应函，使得该药的临床研究无法进一步进行。索利霉素(CEM-101)属氟酮内酯类，正在用于社区获得性细菌性肺炎(community-acquired bactierial pneumonia，CABP)的非劣效性Ⅲ期临床试验，其抗菌谱和泰利霉素相似，其 MICs 是其他酮内酯类的 2 倍。然而，由于该化合物的肝安全性受到质疑，FDA 没有批准该药。此外，在已完成的淋病Ⅲ期临床试验中，索利霉素未能达到非劣效性终点[179-180]。

(一)作用机制

与大环内酯类抗生素类似，酮内酯类通过与细菌的 23S rRNA 结合，结合位点在 50S 核糖体 47 亚单位上的Ⅱ和Ⅴ转肽酶位点上，从而抑制敏感细菌的蛋白质合成[181]。这些药物也能阻断 30S 核糖体单位的形成。虽然酮内酯类药物不能诱导 MLS_B 耐药，但葡萄球菌 *erm* 基因编码的 MLS_B耐药的持续表达可引起葡萄球菌对泰利霉素耐药。虽然这些药物没有显示出受到外排泵的影响，但 23S rRNA 突变、核糖体蛋白 L4 和 L22[182]基因突变或者 *ermB* 基因突变诱导的 rRNA 甲基化[183]可引起酮内酯类药物在体外的耐药。这类药物很少发生耐药选择和诱导出对其他 MLS_B抗菌药物的交叉耐药。

(二)药理学

泰利霉素经口服给药，每天 1 次，每次 800 mg，能在肠道迅速被吸收，服药后 1～2 h 可在血浆中达到 2 μg/ml 峰浓度，2 天可达到稳态，用药 24 h 后达到 0.07 μg/ml 的平均谷浓度[184]。口服的生物利用度为 57%，且不受食物消化的影响。药物的蛋白结合率为 70%，泰利霉素在血浆中呈现双向生物消除作用，其起始和终末半衰期分别为给药后的 2～3 h 和 9～10 h。药物可很好地穿透入支气管肺泡、扁桃体、鼻窦和中耳液，在给药 24 h 后，它在多形核中性粒细胞的胞内浓度与血浆浓度的比值＞500。它的排泄主要是通过肝代谢而经由粪便排出(＜80%)，尿的排泄量小于 15%。肝、肾功能不全的患者不需调整剂量。

(三)抗菌谱

酮内酯类药物对呼吸道致病菌和胞内细菌的抗菌作用较强，因此，被用于治疗社区获得性呼吸道感染。泰利霉素对肺炎链球菌的抗菌效果比大环内酯更好，不管肺炎链球菌对青霉素是否敏感，其 MIC_{90}≤1 μg/ml，90% 的青霉素耐药株可被 0.25 μg/ml 泰利霉素抑制[185]。几乎所有大环内酯类耐药的肺炎链球菌，不论其耐药机制如何，均可被≤0.5 μg/ml 的酮内酯类所抑制[4-5]。泰利霉素比红霉素和克拉霉素的抗菌活性更强，它与阿奇霉素一样对流感嗜血杆菌(MIC_{90}s 为 2～4 μg/ml)和卡他莫拉菌(MIC_{90}s 为 0.06～0.125 μg/ml)有较强的抗菌活性。泰利霉素的活性不受耐药株产生的β-内酰胺酶的影响，但其在 5%CO_2环境中，MICs 升高了 2 倍。对于主要呼吸道致病菌其抗生素后效应可达 9 h[186]。

泰利霉素对葡萄球菌有效，无论金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性的葡萄球菌是否对苯唑西林敏感，该药对它们的 MIC_{90}s 都是从 0.125～0.250 μg/ml。但包含结构性 MLS_B耐药机制的菌株对酮内酯类耐药。对大环内酯和氯林可霉素无耐药的肠球菌对泰利霉素敏感，粪肠球菌和屎肠球菌的 MIC_{90}s为 0.125 μg/ml。但红霉素和氯林可霉素耐药的肠球菌呈现出较高的 MIC_{90}s(4～8 μg/ml)[187]。无论β溶血性链球菌和草绿色链球菌群是否对青霉素敏感，泰利霉素于体外对它们的抗菌效果均较强，小于 0.5 μg/ml 的泰利霉素即可抑制所有菌株。因为 *mefA*(基因介导)药物泵出机制而对红霉素耐药的链球菌仍然表现出对泰利霉素敏感，在那些因为诱导性或结构性 *erm*(基因介导的)对红霉素耐药的菌株中，酮内酯类对它们的 MICs 较高(2～16 μg/ml)。其他革兰阳性球菌，如片球菌属(*Pediococcus*)、明串珠菌属(*Leuconostoc*)、黏滑罗斯菌(*Rothia mucilaginosa*)和马红球菌(*Rhodococcus equi*)对泰利霉素都敏感，MIC_{90}s 从 0.03～0.25 μg/ml。

酮内酯类对革兰阳性杆菌同样有抗菌作用，在浓度＜0.125 μg/ml 时能抑制棒状杆菌属[包括白喉棒状杆菌(*C. diphhtheriae*)和杰氏棒状杆菌(*C. jeikeium*)]、李斯特菌属、乳杆菌属、放线菌属和丹毒丝菌属(*erysipelothrix*)[187]。泰利霉素可抑制消化链球菌属(*Peptostreptococcus* spp.)、普

雷沃菌属、卟啉单胞菌属、嗜胆菌属（*Bilophila* spp.）和产气荚膜梭菌（MIC_{90}s 为 0.125～0.5 μg/ml）。但其不能抑制其他梭菌（*Clostridium* spp.）、梭杆菌属和脆弱拟杆菌群的某些细菌[188]。这些药物对其他革兰阴性杆菌几乎无抑菌作用，如肠杆菌科、不动杆菌属、铜绿假单胞菌和伯氏疏螺旋体[189]。

胞内致病菌对泰利霉素高度敏感，包括军团菌属，支原体和衣原体，其 MIC_{90}s 为 0.004～0.25 μg/ml[185]。立克次体属、巴尔通体属（*Bartonellas* spp.）、贝纳特柯克斯体（*C. burnetii*）和土拉弗朗西斯菌（*F. tularensis*）也对此药敏感。泰利霉素对龟分枝杆菌和鸟分枝杆菌的活性与大环内酯类相当，MIC_{90} 为 4 μg/ml。但它对结核分枝杆菌、牛型结核分枝杆菌（*M. bovis*）和其他非典型分枝杆菌无效[190]。

(四)不良反应

泰利霉素的处方中必须提示注意药物的肝毒性和对于重症肌无力患者可能导致呼吸衰竭，这使得其临床应用受到严格限制。体外研究烟碱乙酰胆碱受体与索利霉素和泰利霉素的相互作用表明，泰利霉素的临床毒性小于索利霉素。但这一预期还没能在人体中得以证实[179]。一般的不良反应，如腹泻（15%）、恶心（9%）、呕吐和头晕尚能为大多数人所接受[191]。临床上尚无关于该药引起艰难梭菌相关性腹泻的报道。小于 10% 的患者可能出现转氨酶水平升高，很少发生严重的肝毒性[192]。由于酮内酯类药物为 P450 CYP3A4 同工酶的拮抗剂和底物，它与其他 CYP3A4 抑制剂（如三唑类抗真菌药）同时服用可能延长 QT 间期[193]。

八、林可酰胺类

林可酰胺（Lincosamide）类抗菌药物包括林可霉素（分离自林可链霉菌）和克林霉素（林可霉素的化学修饰物）。它们的化学结构都含有一个连接了一个氨基糖的氨基酸。相对于林可霉素，克林霉素抗菌作用更强，而且口服吸收率更高[194]。它们既可口服，也可胃肠道外给药，但林可霉素现今在美国极少用于临床，因此，后文将不予讨论。

(一)作用机制

林可霉素通过结合敏感菌核糖体的 50 S 亚基，干扰肽链转运，阻止肽链的延长，从而抑制细菌的蛋白质合成。核糖体的结合位点与大环内酯类、链阳菌素和氯霉素接近或相同[195]。克林霉素可以抑菌也可杀菌，取决于药物浓度、细菌种类和接种的菌量。

(二)药理学

大约 90% 的口服克林霉素被肠道吸收，并且不受消化道食物的影响。口服 150 mg 后 1 h 血清峰浓度可达 2～3 μg/ml。静脉给药 600 mg，1 h 后血清峰浓度可达 10～12 μg/ml。给药后有效血药浓度可维持 6～9 h[196]。

克林霉素在骨、肺、胸膜液和胆汁中分布很好。但即使是对于脑膜炎患者，它也很难进入脑脊液。该药较容易透过胎盘而进入胎儿组织。克林霉素在中性粒细胞和巨噬细胞内可达有效浓度。

克林霉素正常情况下的半衰期为 2.4 h。大部分药物在肝代谢，以失活形式从尿中排出。当患者存在严重的肝病时，药物半衰期延长，用药剂量需减少。虽然在肾功能不全患者中血药浓度会增高，但不需调整剂量。此药不能通过血液透析和腹膜透析而被大量清除。

(三)抗菌谱

克林霉素为需氧革兰阳性球菌和厌氧菌的广谱抗菌药，包括甲氧西林敏感的葡萄球菌属（*Staphylococcus* spp.）、肺炎链球菌（*S. pneumoniae*）、A 群链球菌和草绿色链球菌[194,196]。药物对这些敏感菌株的 MIC_{90}s 为 0.01～0.10 μg/ml。但现在已出现克林霉素耐药的临床分离菌珠菌，它们对红霉素也耐药[4-5,160]。在某些机构中，对克林霉素耐药的金黄色葡萄球菌达到 20%，甚至更高，而在 USA100 MRSA 菌株中对克林霉素的共同耐药率可达 85%。USA300 社区相关性 MRSA 菌株通常对克林霉素敏感。β 溶血性链球菌、肺炎链球菌和草绿色链球菌对克林霉素的耐药应引起注意。肠球菌和所有肠杆菌科细菌对克林霉素均耐药。

克林霉素曾被认为是对厌氧菌最有效的抗菌

药物之一，包括脆弱拟杆菌群的成员和产气荚膜梭菌，其 MIC_{90}s≤2 μg/ml[196-197]。但对克林霉素耐药的菌株正在逐年增加。一项来自美国大型机构的研究显示，超过30%的脆弱拟杆菌对克林霉素耐药，并且一半的多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)也对其耐药[18]。欧洲的研究也表明，30%的临床厌氧菌株对克林霉素耐药，除了脆弱拟杆菌(54%耐药)，普雷沃菌属和其他革兰阴性厌氧菌(31%耐药)，以拟杆菌属和副拟杆菌属(*Parabacteroids* spp.)耐药性为最强[198]。10%～20%梭菌、10%消化球菌(*Peptococci*)，和大部分可变梭杆菌(*Fusobacterium varium*)对克林霉素耐药[18,199]。克林霉素作为单药治疗放线菌病[200]、巴贝虫病[201]和疟疾[202]有显著的疗效，也可与乙胺嘧啶联合治疗弓形虫脑炎[203]，与伯氨喹联合治疗耶氏肺孢子菌肺炎(*Pneumocystis jiroveci pneumonia*)[204]。克林霉素磷酸盐和过氧苯甲酰(1.2%/2.5%)的复方凝胶可用于痤疮的局部治疗。

(四)不良反应

超过20%的患者可发生克林霉素相关性腹泻，产毒艰难梭菌引起的假膜性结肠炎常与该药的使用有关[11]，此并发症非药物剂量相关性，而且可发生于口服和肠胃道外给药。及时停药并同时口服万古霉素、甲硝唑或非达霉素可有效逆转病情。

其他不常见的不良反应包括皮疹、发热和可逆性转氨酶水平增高。克林霉素可阻断神经肌肉传导，在麻醉时可用作神经肌肉阻滞药。

九、四环素类和甘氨酰环素类

四环素(Tetracycline)类是一类拥有氢化并四苯的广谱抑菌类抗菌药物，它含有4个融合的环，根据其有效作用时间的长短分为3组。四环素是短效药，地美环素是中效药物，多西环素和米诺环素是长效药物。地美环素主要用于抗利尿激素分泌失调综合征，通常不作为抗菌药物应用。甘氨酰环素(Glycylcycline)是一组半合成的四环素衍生物，它的9号位点被一个甘氨酰胺所替代。替加环素(米诺环素的9-t-丁基甘氨酰胺衍生物)是甘氨酰环素类药物中第一个用于临床的药物[205]。奥马环素(Omadacycline)是一类与替加环素相关的新型氨甲基环类药物，最近完成了BSSSI和CABP的Ⅲ期临床试验。伊拉环素是一个C-7、C-9双取代氟环药物，已经完成了cIAI的Ⅲ期临床试验，正在进行第二次试验。在第一次治疗cUTI的Ⅲ期临床试验中，伊拉环素的静脉注射-口服转换未取得成功，现在正在以左氧氟沙星-口服转换进行重复试验(www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03032510)。这2种甘氨酰环素类药物具有相似的抗菌谱。对于多重耐药的肠杆菌科细菌，包括碳青霉烯类耐药的菌株，其临床有效活性比替加环素强2倍，但其对铜绿假单胞菌没有抗菌活性[206-207]。

(一)作用机制

四环素类和甘氨酰环素类通过抑制敏感菌的蛋白质合成而实现抗菌作用。它通过能量依赖性过程进入细菌，与核糖体30S亚基可逆性结合，阻止氨基酰-tRNA与RNA-核糖体复合物上核糖体受体A位点的结合[208-209]。四环素类临床耐药株的耐药机制为药物泵出机制激活而从细胞内排出药物、核糖体靶位点的改变阻碍了药物的结合(核糖体保护)或者产生修饰酶灭活药物。由于甘氨酰环素位点9大侧链的位阻效应，该药不受细菌核糖体保护蛋白的影响，并能逃避四环素耐药株大多数药物泵的排出作用。甘氨酰环素对细菌核糖体的亲和力比四环素更高[209]。含有染色体编码的多组分外排泵的肠杆菌科细菌(特别是变形杆菌属、摩根菌属和普罗威登斯菌属)、鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌[210-213]，以及含有 *tet*(X)基因介导的单氧化酶而可降解四环素的某些拟杆菌属[214]，这些细菌的临床菌株对替加环素的敏感性降低。

(二)药理学

四环素在胃肠道吸收不完全，在空腹状态时其吸收率增加。服用食物和其他物质，如二价、三价阳离子抗酸药和铁剂可以降低此药的吸收。食物不影响多西环素和二甲胺四环素的吸收。它们很容易吸收，因此，临床所需剂量较低。标准口服给药2 h后，血药浓度达到峰值(3～5 μg/ml)。也有静脉制剂，静脉给药1 h后，血药浓度达到峰值(3～9 μg/ml)，但这取决于四环素的输注方式

和剂量[215]。临床中，四环素在血清中可达到的最高浓度时，通常为抑菌作用。

这类药物的组织穿透能力良好，但在脑脊液中的浓度低(即使存在脑膜炎时)。四环素可以通过胎盘进入胎儿的骨和牙齿。在人类乳汁中也呈高浓度分泌。因此，不建议妊娠期或哺乳期妇女使用四环素。米诺环素是在生理 pH 下亲脂性最高的四环素类，可在唾液和泪液中达到很高的药物浓度[216]。

大部分四环素类在肝代谢并且集中浓缩于胆汁。胆汁中四环素浓度可比血浆高 3～5 倍，肝功能不全或胆道梗阻患者，其药物会在血浆中累积。多西环素以原药形式在尿中排出，尿排出率占给药剂量的 35%～60%。米诺环素主要通过非肾性途径清除，只有 5%～12% 从尿排出。肾功能不全可延长四环素的半衰期，而多西环素和米诺环素不受其影响[215]。因此，多西环素或者米诺环素可在肾功能不全患者肾外感染时作为四环素类药物的首选。

因为口服替加环素的生物利用度有限，所以，它只适用于静脉给药。在多次给予替加环素(每次 50 mg，每 12 h 一次)后可出现 0.8 μg/ml 的血药峰值[217-218]。虽然替加环素在血液中有 80% 与血浆蛋白结合，但其组织分布迅速而广泛(包括骨组织)，这导致皮肤和软组织的药物浓度比血药浓度高 3～5 倍。无论患者是否存在脑膜炎，其脑脊液中药物浓度均很低，单剂量给予 100 mg，12 h 后，脑脊液中药物浓度仅为 0.025 μg/ml[219]。替加环素主要经过肝的糖脂化并以原型被清除，平均半衰期为 36 h。小于 30% 的药物以原型经尿排泄，肾功能不全、血液透析、或轻中度肝功能不全患者不需调整剂量。

奥马环素和伊拉环素既可口服也可静脉给药[220]。奥马环素的半衰期约为 17 h，静脉给药 100 mg 可获得最大浓度(maximum concentration，Cmax)大约为 1.8 μg/ml[221]。与替加环素一样，奥马环素和伊拉环素可以逃避与四环素耐药相关的核糖体蛋白保护和大多数药物泵出的耐药机制。但是，与替加环素类似，奥马环素和伊拉环素是 AcrAB 多药外排泵(常见于变形杆菌属和克雷伯菌属)及 MexXY 外排泵(见于铜绿假单胞菌)的底物。

(三)抗菌谱

所有四环素类具有类似的抗菌谱，它们对很多革兰阳性菌和革兰阴性菌、支原体、衣原体、立克次体属和一些原虫有抗菌活性。许多需氧革兰阳性球菌，包括金黄色葡萄球菌、酿脓链球菌(*S. pyogenes*)和肺炎链球菌对其敏感。然而，四环素耐药的肺炎链球菌很常见[3-5]。目前，相当比例的大肠埃希菌分离株对多西环素和米诺环素耐药。2010 年的美国传染病学会(Infectious Diseases Society of America，IDSA)指南不推荐膀胱炎和肾盂肾炎患者使用这 2 种药物[222-223]。假单胞菌属和许多肠杆菌科细菌也耐药。多数志贺菌属和沙门菌属菌株对它们耐药。此类药对类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*)、布鲁菌属、弧菌属和海鱼分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)有抗菌活性，因此，它们已经成功用于这些细菌感染的治疗[224]。霍乱弧菌耐药株的出现使得此类药物对于霍乱的治疗效果欠佳[225]。米诺四环素对于诺卡菌属有活性[226]。尽管 MDR 的不动杆菌属和嗜麦芽窄食单孢菌对各种其他的抗菌药物耐药，但米诺环素是对这些致病菌抗菌活性最强的药物，它们中的绝大部分菌株对米诺环素都敏感[227-228]。这也使人们对应用米诺环素治疗这些细菌引起的感染重新产生了兴趣。尽管厌氧菌的耐药菌株正在广泛地增加，一些厌氧菌仍然对四环素类敏感[229]。据最新报道，替加环素也仍然对大多数厌氧菌具有抗菌活性[230]。

此类药物对于治疗沙眼衣原体、解脲脲原体和人型支原体引起的尿道炎和急性盆腔炎是有效的。淋病奈瑟菌菌株中，耐药很普遍[231]。这些药物有效用于其他衣原体感染(如鹦鹉热、性病淋巴肉芽肿和沙眼)的治疗[21]。其他能应用四环素治疗的感染包括腹股沟肉芽肿、软下疳、回归热和兔热病。四环素类可用于治疗立克次体感染(落基山斑疹热、流行性斑疹伤寒和恙虫病、Q 热)。许多螺旋体，如梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)和伯氏疏螺旋体(*B. burgdorferi*)都对其敏感[21,232]。原生动物如恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)和溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*)也可以被四环素类药物抑制[170,232]。

美国 FDA 已批准替加环素用于复杂的皮肤

和皮肤组织感染、cIAI 和 CABP 的治疗。但是，在 2013 年 10 月，处方信息做了更新，以黑框警告，与对照药物比较，接受替加环素治疗的患者病死率增加。尽管病死率增加的原因尚未明确，但美国 FDA 推荐，只有当备选方案不合适时才选用替加环素。病死率的增加可能与较低的血药浓度（即<1 μg/ml）有关，正如包装标签上说明的那样，每 12 h 给药 50 mg 的给药方案才能达到以上血药浓度[205, 233]。替加环素在≤1 μg/ml 时能抑制绝大部分葡萄球菌，包括对甲氧西林耐药和万古霉素中介耐药的菌株。替加环素对万古霉素敏感和耐药的肠球菌的 MIC_{90}s 为 0.25～0.5 μg/ml，对屎肠球菌和粪肠球菌具有相同的抑制作用。但是，杀菌时间曲线研究显示替加环素对葡萄球菌和肠球菌不具有杀菌活性。铜绿假单胞菌一律对替加环素耐药。

草绿色链球菌群、β-溶血性链球菌和 MDR 肺炎链球菌对替加环素高度敏感，它们的 MIC_{90}s 为 0.25～0.50 μg/ml。替加环素对大部分肠杆菌科和非发酵革兰阴性菌，包括产 ESBLs 菌株，具有抗菌活性，其 MIC_{90}s≤2 μg/ml。它也能抑制 MDR 鲍曼不动杆菌和嗜麦芽窄食单胞菌，其 MIC_{90}s 为 2 μg/ml[234-235]。对于苛养的呼吸道病原体流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌，替加环素的 MIC_{90}s 分别是 0.5 μg/ml 和 1 μg/ml。变形杆菌属、摩根菌属（*Morganella*）、普罗威登斯菌属和铜绿假单胞菌通常对替加环素耐药（MIC_{90}s>16 μg/ml）。替加环素对大部分脆弱拟杆菌群分离株（MIC_{90}=8 μg/ml）、消化链球菌属（MIC_{90}=4 μg/ml）、梭状芽胞杆菌属（MIC_{90}=0.50 μg/ml）、普雷沃菌属、痤疮丙酸杆菌（*Cutibacterium*）和梭菌属（*Fusobacterium*）有一定的抗菌活性[67, 236]。

替加环素对肺炎支原体、人型支原体、肺炎衣原体和沙眼衣原体抗菌活性较四环素类更强，其 MIC_{90}s 为 0.125～0.5 μg/ml。对于解脲脲原体和军团菌，其抗菌活性较四环素弱，MIC_{90}s 为 8 μg/ml。对于快速生长的分枝杆菌，包括脓肿分枝杆菌、龟分枝杆菌和某些偶发分枝杆菌（*M. fortuitum*），替加环素比四环素类的抗菌活性高 4～11 倍（MIC_{90}s≤0.25 μg/ml）[237]。但是缓慢生长的非结核分枝杆菌，如堪萨斯分枝杆菌（*M. kansasii*）、海分枝杆菌（*M. marinum*）和蟾分枝杆菌（*M. xenopi*），对替加环素的敏感性较米诺环素低。

替加环素的药敏试验应该用新鲜配制的培养基或含有生物催化作用的氧化还原剂（如去氧酶），因为该药物易被氧化降解。用非新鲜配制的肉汤培养基（放置时间超过 12 h）做药敏试验产生的 MIC 结果比新鲜培养基获得的结果高 1～2 稀释度[238]。已有报道，含高浓度 Mn^{2+}（>2.5 ppm）的商品化培养基能增加替加环素药敏试验的 MICs[238]。

奥马环素和伊拉环素的抗菌谱与替加环素相似，对 MDR 肠杆菌科（包括碳青霉烯类耐药菌株）具有抗菌活性，但对铜绿假单胞菌无抗菌活性[206-207]。奥马环素对许多革兰阴性病原体的作用往往比替加环素稍弱，而伊拉环素则比替加环素稍强。随着这 2 种新化合物的现有数据不断增加，这一组药物的进一步分类将是必要的。表达 ArcAB 外排泵的肺炎克雷伯菌分离株对替加环素、奥马环素和伊拉环素的敏感性降低[239-240]。

（四）不良反应

四环素类对上消化道有刺激作用，可导致食管溃疡、恶心、呕吐和上腹部不适。四环素类的使用可引起肠道菌群失调而常导致腹泻，长期使用该药可导致假膜性肠炎。过敏反应较为罕见，通常表现为荨麻疹、固定性药疹、麻疹样皮疹和过敏反应。四环素类之间必然发生交叉反应。所有类似物，特别是去甲金霉素可能发生光敏反应，即暴露在阳光下的部位出现红斑[241]。

已有报道，米诺环素可引起眩晕，其许多类似物可引起良性颅内压增高（假性脑瘤）[242]。四环素通过抑制蛋白质合成，增加氨基酸代谢引起的氮质血症，从而加重已有的肾衰竭。在牙齿和骨骼的发育期，使用四环素类可引起骨骼生长抑制、牙齿永久性变色及牙釉质发育不全[243]。因此，通常儿童（<8 岁）及孕妇应避免使用该类药物。替加环素具有良好的耐受性，但也有一个显著的例外．在注册研究中，替加环素组恶心和呕吐的发生率均显著高于对照组。最近发表的伊拉环素关于复杂性腹腔内感染的Ⅲ期研究再次表明恶心是这一类药物的副作用。然而，奥马环素和伊拉环素的临床研究中，只报道了轻微的恶心[220]。其他不良反应中最常见的是头痛和腹泻。由于其在牙齿和骨骼发育中的不良反应与四环素类似，因此，

妊娠期、哺乳期和18岁以下的人群禁用。它可能会和四环素类存在交叉过敏反应[245]。

十、糖肽类和脂肽类

万古霉素（Vancomycin）是从东方链霉菌（*Streptomyces orientalis*）中获得的一种杀菌类抗生素，是唯一在美国临床上应用的非脂糖肽类抗生素。起初引入临床是由于它对青霉素耐药的葡萄球菌具有活性，现在它已成为耐甲氧西林葡萄球菌及对青霉素类或头孢菌素类过敏患者最有效的抗生素。替考拉宁（Teicoplanin）（以前称壁霉素A）是一个化学结构上与万古霉素相关的糖肽类复合物[246]。除美国外，目前，世界上大多数国家都已用于临床。达巴威新、奥利万星和特拉万星是半合成的脂糖肽类（有疏水基的糖肽衍生物），这3种药物在美国已批准用于临床[247-250]。达巴威新和奥利万星只被FDA批准用于皮肤和皮肤组织的感染，但是临床上它们被用于许多FDA没有批准的适应证。达托霉素是唯一的天然的环脂肽类抗生素，它由玫瑰胞链霉菌（*Streptomyces roseosporus*）发酵产生，对革兰阳性菌的抗菌活性优于万古霉素。

（一）作用机制

糖肽类（Glycopeptides）通过与细胞壁前体D-丙氨酰-D-丙氨酸结合抑制细菌细胞壁肽聚糖的合成。万古霉素和替考拉宁的耐药可能源于以下2种机制之一：①耐万古霉素肠球菌胞浆中一系列酶合成了异常肽聚糖前体，该前体终止于D-丙氨酰-D-乳酸或D-丙氨酰-D-丝氨酸残基（取代正常的D-丙氨酰-D-丙氨酸残基），从而显著降低糖肽类药物的亲和力。②在VISA中，肽聚糖前体（胞壁质单体）累积，形成一个能“捕获”药物分子的增厚的细胞壁，它能阻止药物进一步扩散进入细胞壁的内部各层[251]。

达托霉素通过钙离子依赖的疏水性尾部分子的插入，不可逆地结合敏感细菌的细胞膜，导致细胞膜的渗透性大面积受损[252]，其结果是细胞非裂解性死亡，这使得该药物具有潜在的杀菌活性。但它无法穿透革兰阴性菌的外膜。已经出现对达托霉素敏感性降低或耐药的肠球菌[253-254]和金黄色葡萄球菌[255-256]菌株，这可能是由于存在与VISA类似的细菌细胞壁增厚形成的物理屏障、细胞外膜的电荷改变[257]或编码各种细菌酶的点突变的累积[258]。

奥利万星、达巴威新和特拉万星具有双重作用机制：①通过与D-丙氨酰-D-丙氨酸残基形成复合物，抑制细胞壁肽聚糖合成中的转糖基过程。②细菌细胞膜的去极化。膜电位去极化的效果取决于脂质Ⅱ的存在，以及特拉万星和D-丙氨酰-D-丙氨酸残基之间的相互作用，该作用可影响多种金黄色葡萄球菌菌株，也包括那些对万古霉素和达托霉素敏感性降低的菌株[259-260]。

在VISA分离株中，其对于特拉万星、达巴威新和奥利万星的MICs升高；因此，在对万古霉素不敏感的菌株使用这些新的药物之前都需要进行充分的敏感性试验[261]。

（二）药理学

万古霉素可口服和静脉给药。口服给药吸收较差，在大便中可达到高浓度，因此，可用于假膜性肠炎的治疗[262]。在健康人群，每12 h静脉注射1 g万古霉素后，血清中可达到所需的峰值和谷浓度，其浓度分别是20～50 μg/ml和5～15 μg/ml[263]。药物在滑膜腔、腹腔积液、心包积液和胸腔积液中可达到治疗浓度，但只有在脑膜炎时药物才能渗透进入脑脊液[264-265]。

在肾功能正常的患者中，万古霉素的血清半衰期为6 h，它全部通过肾小球滤过作用清除。严重肾功能不全时，万古霉素的清除时间延长至9天。它可以通过血液透析清除，这取决于所用的膜和透析器的类型。虽然以往的经验认为糖肽类不能通过腹膜透析而清除，但其实际清除程度仍存在争议。

以6 mg/kg给药方案静脉滴注达托霉素时，其血药峰值和谷值分别是82 μg/ml和6 μg/ml。约90%的药物与血浆蛋白结合，这限制了该药的代谢。其表观分布容积低至0.1 L/kg，提示药物渗透到感染部位可能是个问题。达托霉素对脑脊液和肺泡腔的渗透能力很差，且可与肺泡腔的表面活性剂结合，因此，该药不用于脑膜炎和肺炎的治疗[266]。达托霉素的清除半衰期为9 h，80%的药物通过肾脏排出，其中2/3仍为原药形式[266]。当肌酐清除率≤30 ml/min时，给药间隔可延长至48 h。

特拉万星在人血浆中约有95%与蛋白结合，它能很好地渗透进入组织，半衰期为7～9 h。在体内，其杀菌活性具有浓度依赖性[267]。该药物通过尿排出体外，75%为原药形式。血液透析能清除约6%的特拉万星，在肾功能不全时（肌酐清除率<50 ml/min），必须减少用药剂量[268]。

达巴威新与人血浆蛋白的结合率约为93%，表观分布容积为0.15 L/kg[269]。该药还具有长达240 h的终末半衰期，在动物和人体研究中均显示良好的组织渗透性[270]。与万古霉素和替考拉宁相反，达巴威新的清除具有肾途径和非肾途径两种机制，大约只有给药剂量的30%可随尿排泄[270]。

和特拉万星及达巴威新相似，奥利万星也具有很高的蛋白结合率，游离部分约为15%[271]。与特拉万星及达巴万星相比，奥利万星需要更复杂的三相清除，是3种脂肽类药物中终末半衰期最长的药物，约340 h。奥利万星不被代谢，给药7天后，在粪便和尿中回收率分别为1%和5%。其分布也相当广泛，可以渗透到各个组织。

(三)抗菌谱

糖肽类和脂肽类的抗菌活性主要是针对需氧和厌氧革兰阳性菌，包括甲氧西林敏感和耐药的葡萄球菌、链球菌、肠球菌、棒杆菌属（*Corynebacterium*）、芽胞杆菌属、单核细胞增生李斯特菌、梭状芽胞杆菌属和放线菌属。万古霉素对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、链球菌和肠球菌的MICs通常为0.25～2 μg/ml[272]。达托霉素[273-274]对这些革兰阳性菌的抗菌活性是万古霉素的2～4倍，而特拉万星、达巴万星和奥利万星的MICs比达托霉素至少低1/2[275-276]。虽然在肠球菌[277]和葡萄球菌中，万古霉素中介耐药比完全耐药的分离株更常见[278]，但临床上已经出现了耐万古霉素的分离株。这些菌株中，万古霉素与达托霉素和脂糖肽类的交叉耐药差别很大。

对青霉素过敏患者，万古霉素可有效用于革兰阳性菌引起的感染性心内膜炎的预防和治疗[145]。它是治疗杰氏棒状杆菌（*Corynebacterium jeikeium*）感染的药物[279]，并可用于抗菌药物相关艰难梭状芽胞杆菌结肠炎的治疗[135]。

糖肽类和脂肽类对革兰阴性菌或分枝杆菌无抗菌活性。它们与其他不相关的抗菌药物不存在交叉耐药，与氨基糖苷类或利福平合用时对葡萄球菌、链球菌、肠球菌有协同作用[280-281]；与氨基糖苷类联合用时对李斯特菌属有杀菌作用。在体外，达托霉素对大多数生长期或静止期的革兰阳性菌呈现浓度依赖性的杀菌作用[282]。达托霉素对葡萄球菌（包括VISA）、肺炎链球菌和链球菌的MDR株的MIC_{90}s通常≤1 μg/ml[283-284]；对万古霉素敏感和耐药的肠球菌有相同的抑制作用，其MIC_{90}s≤4 μg/ml。达托霉素对李斯特菌属（*Listeria* spp.）、棒杆菌属、丙酸杆菌属、痤疮丙酸杆菌、艰难梭状芽胞杆菌、产气荚膜梭状杆菌和消化链球菌属具有抗菌活性（MIC_{90}s≤2μg/ml）[285-286]。明串珠菌、片球菌属（*Pediococcus* spp.）和乳酸杆菌属对达托霉素敏感。对其他梭状芽胞杆菌、放线菌属和真杆菌属（*Eubacterium* spp.），达托霉素的MIC_{90}s的范围是4～16 μg/ml。达托霉素体外的最佳活性取决于培养基中钙离子的浓度，因此，该药物药敏试验的培养基应含有推荐浓度50 μg/ml的钙离子。纸片扩散法检测达托霉素的敏感性不可靠，因此，不再推荐使用。琼脂稀释法的效果也尚未得到验证。

脂糖肽类的抗菌谱和糖肽类相似，对很多革兰阳性菌的抗菌效果比万古霉素和替考拉宁更强[287-289]，对MSSA、MRSA和凝固酶阴性葡萄球菌的MIC_{90}s为0.06 μg/ml（达巴万星）～1 μg/ml（奥利万星）。虽然，脂糖肽类对糖肽类敏感菌株的MICs高于糖肽类，但是VISA、hVISA和VRSA分离株对脂糖肽类更敏感，其MICs为0.5～4 μg/ml[268,289]。对于那些对达托霉素和利奈唑胺敏感性减低的葡萄球菌，脂糖肽类仍有抗菌活性。万古霉素敏感的肠球菌能被0.06～1.00 μg/ml的达巴万星、奥利万星和特拉万星抑制。脂糖肽类对粪肠球菌的MICs是屎肠球菌的2倍。VanA和VanB表型的耐万古霉素肠球菌通常也对脂糖肽类耐药；达巴万星和特拉万星（不包括奥利万星），其MIC_{90}s是4～64 μg/ml[268,288-290]。这些药物对链球菌最有效，包括MDR的肺炎链球菌，其MIC_{90}s为0.015～0.125 μg/ml[290]。特拉万星对放线菌属、艰难梭状芽胞杆菌、产气荚膜梭状芽胞杆菌、棒状杆菌属（包括杰氏棒状杆菌）、乳酸杆菌和痤疮丙酸杆菌呈现较强的抗菌活性，其MIC_{90}s为0.06～1.00 μg/ml[291]。20世纪90年代末以来，漫长的药物研发史显示奥利万星的药敏试验产生了不同的MICs。最初人们不了解

脂糖肽易黏附于塑料上的特性，导致了人为因素的高 MIC 值。现在，可以在药敏试验培养基中加入表面活性剂阻止药物的吸附，从而发现脂糖肽对许多微生物，尤其是葡萄球菌，其 MIC 呈现较低水平[271,292]。

(四)不良反应

万古霉素最常见的不良反应是发热、寒战和注射部位的静脉炎。快速或大剂量注射万古霉素可引起嗜碱性粒细胞和肥大细胞释放大量组胺而导致“红人综合征”，即面部、颈部和胸部皮肤发红及刺痛感[293]。该症状的产生并不是由超敏反应引起，特拉万星也可导致这一症状。高达 5% 的患者可出现过敏性斑丘疹或弥漫性红斑疹。使用糖肽类抗菌药物极少导致可逆性白细胞减少症或嗜酸性粒细胞增多症。

据报道，接受较高的日剂量万古霉素治疗的患者，尤其是当年龄＞50 岁时，可因药物的耳毒性而发生高频听力减退[294]。万古霉素诱导的肾毒性少见，但当患者的使用剂量＞4 g/d 或与氨基糖苷类抗菌药物联用时，其发生风险增高[295]。自万古霉素引入临床后，随发酵物纯度的不断提高，监测万古霉素血药浓度以降低其肾毒性风险的必要性逐渐减小了。

达托霉素常见的不良反应包括腹泻、皮疹、眩晕和呼吸困难。达托霉素还可引起可逆性的血清肌酸激酶水平升高(一种延迟药物代谢的效应)、肌痛和肌病[296-297]，但这些不良反应可随着用药剂量和用药次数(每日 1 次)的减少而明显减轻。此外，关于临床中使用达托霉素后引起嗜酸粒细胞性肺炎的报道越来越多，并且在停药后缓慢恢复[298]。肾毒性的产生与服用特拉万星时患者的临床病情相关。已经更新到 2016 年 5 月的美国药品说明书警示，MRSA 相关性肺炎的患者使用特拉万星治疗时，若肌酐清除率小于 50 ml/min，其肾毒性发生率和死亡率将升高。因此，治疗 MRSA 相关性肺炎时，只能在其他药物不可接受时才使用特拉万星。特拉万星最常见的不良反应(发生率＜10%)为味觉障碍、恶心、呕吐和泡沫尿[268]。特拉万星被归类为 C 类药物，可用于孕妇，但实验发现临床剂量的特拉万星对 3 种动物有致畸作用。因此，特拉万星仅用于没有其他药物可供选择的孕妇。达巴威新和奥利万星目前只被批准用于急性细菌性皮肤和皮肤组织感染，其临床应用较为局限。到目前为止，这类药物处方信息和临床经验均未显示出任何意外的不良事件。

十一、链阳菌素

链阳菌素(Streptogramin)是链霉菌属细菌产生的天然环状肽。链阳菌素是一类独特的抗生素，由至少 2 种结构不相关的成分(A 组和 B 组链阳霉素)组成，这些成分对敏感菌有协同作用[299]。A 组链阳菌素是通过内酰胺键和内酯键与唑环组成的多不饱和大环内酯的结合，其主要化合物成分是普那霉素 $Ⅱ_A$ 和普那霉素 $Ⅱ_B$。B 组链阳菌素是一种环六肽内酯，主要包括普那霉素 $Ⅰ_A$ 和 $Ⅰ_C$。在美国，达福普汀是第一个可以用于临床注射的链阳菌素类抗生素，由半合成链阳菌素奎奴普丁和达福普汀按一定的比例(30：70)混合而成，两者分别是水溶性普那霉素 $Ⅰ_A$ 和普那霉素 $Ⅱ_A$ 的衍生物。

(一)作用机制

链阳菌素可通过抑制细菌蛋白质合成而对敏感菌发挥协同杀菌效应。链阳菌素通过被动扩散作用进入细菌体内，并能特异性且可逆地与 70S 核糖体的 50S 亚基结合。A 组链阳菌素与核糖体结合后可诱导核糖体的构象改变，从而增强其对 B 组链阳菌素的亲和力。A 组链阳菌素抑制肽链延长步骤中的肽键形成，而 B 组链阳菌素释放 50S 亚基上不完全的肽链[154]。

链阳菌素获得性耐药的产生可能是由染色质或质粒介导的，主要通过对 23S rRNA 的甲基化修饰而改变药物的作用靶点，由此导致细菌对所有的大环内酯类、林可酰胺类和 B 组链阳菌素(MLS_B耐药表型)耐药，而对 A 组链阳菌素不耐药。其他原因，如 L22 核糖体蛋白基因(*rpIV*)的突变、A 组和 B 组链阳菌素外排泵的激活以及链阳菌素 A 乙酰基转移酶和链阳菌素 B 水解酶的产生也有报道。

(二)药代动力学

奎奴普汀-达福普汀通过静脉给药，能分布到大多数组织中。这两种组分都有很高的蛋白结合

率(70%～90%),能通过肝结合处理并经胆道排泄,从而迅速从血浆中清除[300]。通过尿排出的该药物复合物小于20%。按7.5 mg/kg静脉给药后,奎奴普汀和达福普汀的血药浓度峰值可分别达到2.7 μg/ml和7.2 μg/ml,两者的半衰期分别为1 h和0.75 h。这两种成分可渗入并在巨噬细胞中积累,体外实验显示胞内和胞外的峰浓度比为50∶35。在没有炎症时,奎奴普汀和达福普汀几乎不能通过血脑屏障或胎盘屏障。当患者肾功能不全(肌酐清除率<30 ml/min)时,必须调整用药剂量。透析只能部分清除该药。

(三)抗菌谱

链阳菌素主要对革兰阳性菌有抗菌活性,对某些革兰阴性菌和厌氧菌有中度抗菌活性。奎奴普汀-达福普汀对MSSA、MRSA、凝固酶阴性的葡萄球菌和链球菌有较强的杀菌活性,其MIC_{90}s≤1 μg/ml,最低杀菌浓度(minimum bactericidal concentrations,MBCs)在2～4倍MICs之内[301-302]。对β-内酰胺类、大环内酯类和喹诺酮类耐药的葡萄球菌,及包括肺炎链球菌在内的链球菌,通常仍然对奎奴普汀-达福普汀敏感,但奎奴普汀-达福普汀对因23S rRNA结合位点甲基化而具有MLS_B耐药表型葡萄球菌仅有抑菌作用而无杀菌作用[301]。大多数屎肠球菌对奎奴普汀-达福普汀敏感(MIC_{90}s≤4 μg/ml),粪肠球菌因能激活达福普汀外排泵而对其天然耐药(MIC_{90}s≥32 μg/ml)。奎奴普汀-达福普汀虽然对肠球菌无杀菌作用,但它对万古霉素耐药屎肠球菌(VanA或VanB表型,包括MDR菌株)有抑菌作用,其MIC_{90}s≤2 μg/ml[300]。这为治疗严重的MDR革兰阳性菌引起的感染提供了一种选择[296,303-304]。脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌、肺炎支原体、肺炎衣原体和嗜肺军团菌均对该药高度敏感(MIC_{90}s≤2 μg/ml)。奎奴普汀-达福普汀对卡他莫拉菌和流感嗜血杆菌也有效,其MIC_{90}s≤4 μg/ml。肠杆菌科和其他非发酵革兰阴性杆菌通常对其耐药。产气荚膜梭状芽胞杆菌和艰难梭状芽胞杆菌是厌氧菌中对奎奴普汀-达福普汀最为敏感的2种细菌(MIC_{90}s=0.25 μg/ml)。奎奴普汀-达福普汀能有效抑制脆弱拟杆菌群(MIC_{90}=4 μg/ml),以及包括普雷沃菌属、卟啉单胞菌属、梭杆菌属、痤疮丙酸杆菌、乳杆菌属和消化链球菌在内的厌氧菌,其MIC_{90}s为2～4 μg/ml。

(四)不良反应

静脉注射部位的静脉炎是主要的局部不良反应,其发生率和严重程度与药物剂量和浓度相关,因此,通常推荐通过中心静脉导管给药[300,305]。最常见的全身性不良反应是关节痛和肌痛,其发生率高达47%,可能导致治疗终止,但停药后关节痛和肌痛可消失而恢复正常[30]。血清转氨酶水平升高、皮肤瘙痒、烧灼感及面部、颈部或上躯干出现红斑反应等也曾有报道。

十二、唑烷酮类

噁唑烷酮(Oxazolidinone)类是一种于20世纪70年代首次发现的纯化学合成抗菌药物[307]。目前,唑烷酮类仅有利奈唑胺和泰地唑胺(tedizolid)可用于临床[308-309]。其他类似物正在进行临床使用前的研发或临床试验,其中包括用于治疗结核病的唑烷酮类药物[310]。

(一)作用机制

唑烷酮类通过阻止功能性起始复合物的形成来抑制细菌蛋白质的合成[311],该复合物由$tRNA^{fMet}$、mRNA、起始因子和核糖体组成。

利奈唑胺通过与50S亚基的23S rRNA中的结构域Ⅴ区结合,破坏$tRNA^{fMet}$的结合位点并抑制功能性的70S起始复合物的形成,从而抑制mRNA的起始翻译。就这一点而言,此类药物是独特的,它和其他能够抑制核糖体蛋白质合成的抗菌药物无交叉耐药。临床分离的MRSA、耐万古霉素的肠球菌和肺炎链球菌对利奈唑胺耐药性的产生是由于23S rRNA的Ⅴ区域基因点突变[312-313]、L3L4核糖体蛋白突变和*cfr*基因编码的甲基化转移酶而导致的[314]。令人担忧的是这些突变机制是由可移动基因元件介导的。而泰地唑胺似乎保留了对含*cfr*基因细菌的抑菌活性[309]。革兰阴性菌因为能产生内源性的外排泵,可导致唑烷酮类对其无抗菌活性[311]。

(二)药理学

利奈唑胺和泰地唑胺都可通过口服或肠外给药。2种药物口服给药能快速而充分地吸收(生物

利用度>95%)。口服 600 mg 利奈唑胺 2 h 后可达血药浓度峰值 15~20 μg/ml[315]。药物主要在肝内代谢,半衰期约为 5 h。因 30% 的药物可与蛋白质结合,药物在包括脑脊液在内的各组织中分布良好[316]。药物主要通过肾清除,30% 的药物以原药的形式通过尿排出。肾功能不全或轻中度肝功能不全的患者无须调整用药剂量。血液透析可清除 20% 的药物[317]。泰地唑胺的剂量为每天 200 mg,比利奈唑胺的剂量低得多,目前,泰地唑胺仅适用于皮肤和软组织感染。与利奈唑胺相比,泰地唑胺对许多病原体的药效有所提高,但美国处方信息提供的 2 种制剂的 *f*AUC/MIC 值显示,泰地唑胺在当前剂量下的 *f*AUC/MIC 值明显低于利奈唑胺,因此,对泰地唑胺和利奈唑胺的临床数据进行比较和推断时应更加谨慎。

(三)抗菌谱

唑烷酮类对大多数革兰阳性菌和分枝杆菌的抗菌活性各不相同。利奈唑胺对葡萄球菌(包括耐甲氧西林菌株)、链球菌和 MDR 肠球菌的抗菌活性强,其 MIC_{90}s 为 1~4 μg/ml[318-320]。相比之下,泰地唑胺的 MIC_{90}s 一般为 0.12~0.25 μg /ml。此外,利奈唑胺对肺炎链球菌的 MIC_{90}s 为 0.5~2.0 μg/ml,而泰地唑胺的 MIC_{90}s 为 0.25μg /ml。

虽然唑烷酮类一般通过抑制细菌而发挥其抗菌作用,但其对大多数肺炎链球菌有杀菌作用。唑烷酮类还可以抑制其他一些细菌,包括放线菌属、蜡样芽胞杆菌、棒杆菌属、明串珠菌属、片球菌属、马红球菌、单核细胞增生李斯特菌、梭状芽胞杆菌属和革兰阳性厌氧球菌[285]。缓慢生长型和快速生长型分枝杆菌属,以及诺卡菌属对利奈唑胺和泰地唑胺敏感,两者 MIC_{90}s ≤ 8 μg/ml[321-322]。利奈唑胺和泰地唑胺是治疗皮肤和软组织感染时可供选择的药物[323]。然而,目前只有利奈唑胺有治疗呼吸道感染[324]、耐万古霉素肠球菌感染[327-328]及耐甲氧西林葡萄球菌感染[325-326]的数据。

(四)不良反应

最常见的药物相关不良反应包括腹泻、头痛和恶心(发生率为 5%)[329-330]。延长利奈唑胺的用药(通常指用药时程>28 天)可导致罕见的视神经病变[331]、周围神经病变[332]和骨髓抑制(包括贫血、白细胞减少、血小板减少和全血细胞减少症),这些不良反应在停药后是可逆的[333-334]。如同乳酸酸中毒一样,所有这些不良反应的原因均与利奈唑胺能结合并干扰线粒体 RNA 相关[335]。作为一种单胺氧化酶的轻度非选择性抑制剂,利奈唑胺可与肾上腺素或 5-羟色胺类药物相互作用,当利奈唑胺与选择性 5-羟色胺重吸收抑制剂和其他 5-羟色胺激活剂联用时,可引起罕见的血清素综合征[336]。泰地唑胺似乎很少发生上述利奈唑胺的不良反应[309]。然而,这可能是由于泰地唑胺的用药剂量较低,以及 AUC 曲线下面积比利奈唑胺的低。通过数据分析可以推断出,使用高剂量的泰地唑胺时也会出现利奈唑胺的不良反应[337]。

十三、磺胺类与甲氧苄啶

磺胺(Sulfonamide)类是美国 20 世纪 30 年代使用的第一种有效的、可全身用药的抗菌药物。磺胺类源自磺胺,其化学特性与细菌叶酸生成过程中必备因子——对氨基苯甲酸类似。附着在苯环核上的磺酰基的各种替代基团可增强其抗菌活性,同时也决定了该药物的药理学特性。

甲氧苄啶(trimethoprim,TMP)是一种嘧啶类似物,通过抑制二氢叶酸还原酶的活性而干扰细菌叶酸代谢、嘧啶合成和一碳单位片段的代谢,从而起到抗菌作用。由于甲氧苄啶与磺胺类抗生素作用于细菌叶酸代谢通路的不同位点,因此,两者的抗菌活性相互增强且对很多细菌有协同抗菌作用。这种组合,即甲氧苄啶-磺胺甲噁唑(TMP-sulfamethoxazole,TMP-SMX),也称复方磺胺甲噁唑,于 1968 年开始应用于临床,并已证实它可以有效治疗多种感染[338]。

(一)作用机制

磺胺类抗菌药通过竞争性抑制对氨基苯甲酸的修饰作用而阻碍二氢叶酸的合成,而 TMP 抑制二氢叶酸还原酶的活性,由此导致叶酸的代谢过程被抑制而最终阻碍细菌 DNA 的合成[339]。哺乳类动物细胞不能合成叶酸,因此,人体嘌呤的合成几乎不受磺胺类或 TMP 的影响。但在接受高剂量叶酸治疗的患者中,其抗菌效果可能会降低。

(二)药理学

磺胺类的给药途径通常为口服或局部用药。目前,在美国唯一的静脉剂型是 TMP-SMX。醋酸磺胺米隆(磺胺膏)和磺胺嘧啶银可外用于烧伤患者,并且经皮肤吸收良好。磺乙酰胺可用于眼科疾病。

磺胺类经口服给药后能迅速而完全地通过胃肠道吸收。它们在肝经乙酰化和葡萄糖醛酸化而代谢,以游离药物和无活性代谢产物的形式通过肾脏排泄。磺胺类能在血浆中竞争性地结合白蛋白上的胆红素结合位点,从而提高血液中游离胆红素的浓度,而血液中胆红素水平的提高可能导致胆红素脑病。因此,磺胺类抗菌药禁用于新生儿。

磺胺类在体内分布广泛,脑脊液、关节腔积液、胸腔和腹水中的浓度可达到血清浓度的 80%,并且能快速通过胎盘屏障进入胎儿血液循环。磺胺类可用于肾衰竭患者,但长期使用磺胺类,可因肾排泄功能不全而导致药物在体内蓄积。

TMP 仅适合口服给药,胃肠道几乎能完全吸收。常规剂量 100 mg 给药后,1～4 h 内能达到血药浓度峰值 1 μg/ml。甲氧苄啶在体内可广泛分布于肾、肺、前列腺和体液中[340]。该药在脑脊液中的浓度约为血清浓度的 40%。健康人血液中的半衰期约为 10 h,而肾功能不全患者的半衰期会延长。高达 80% 的药物通过肾小管以原药的形式分泌排出,另外 20% 以无活性代谢产物形式通过肾或胆汁排出。

TMP-SMX 中 TMP 与 SMX 以 1∶5 联合使用时,可通过口服或静脉给药。160 mg TMP 联合 800 mg SMX 静脉给药 1 h 后,可达到的血药浓度峰值,分别为 3.4 μg/ml 和 47.3 μg/ml,同样的剂量口服 2～4 h 后可达到同样的峰值。TMP-SMZ 在体内分布广泛,脑脊液中也可达到治疗浓度(约为血清浓度的 40%)。该药物主要通过肾排泄,当患者肌酐清除率≤30 ml/min 时,应适当减少用药剂量。TMP 和 SMX 可以通过血液透析完全清除,而腹膜透析仅能部分清除。

(三)抗菌谱

磺胺类能抑制多种革兰阳性菌、革兰阴性菌、放线菌、衣原体、弓形虫和疟原虫,其体外的抗菌活性因细菌接种量和培养基成分的不同而异,其药敏试验因为纸片法出现薄雾现象和肉汤稀释法出现“拖尾”现象而难以判断敏感性试验的终点。

磺胺类与乙胺嘧啶已成功地联合用于弓形虫病的治疗[170]。磺胺类对星状诺卡菌[226]有抗菌活性,而对堪萨斯分枝杆菌、偶发分枝杆菌群的一些细菌、海分枝杆菌和瘰疬分枝杆菌(*Mycobacterium scrofulaceum*)有中度抗菌活性[341]。此外,磺胺类还可用于治疗类鼻疽、疱疹样皮炎、性病淋巴肉芽肿和软下疳。

革兰阴性杆菌中,大肠埃希菌对磺胺类起初敏感,特别是当尿中可达到有效药物浓度时,然而近年来细菌耐药性的不断增加限制了该药的效果。而黏质沙雷菌、铜绿假单胞菌、肠球菌和厌氧菌通常对磺胺类耐药。

体外实验中,TMP 对革兰阳性球菌和大多数革兰阴性杆菌有抗菌活性。铜绿假单胞菌、大多数厌氧菌、肺炎支原体和分枝杆菌常对其耐药。MICs 可因所用培养基的不同而各异。与磺胺类药物类似,甲氧苄啶主要用于治疗其敏感菌引起的非复杂性和复发性尿路感染[342]。而如今,对 TMP 耐药的肠杆菌科细菌已非常普遍。

体外实验已经证实,TMP 联合其他种类抗生素(如利福平、多黏菌素和氨基糖苷类)对各种革兰阴性杆菌有协同抗菌活性。此外,TMP 联合氨苯砜还可有效治疗免疫缺陷患者的耶氏肺孢子菌肺炎。

包括葡萄球菌和链球菌(除 A 群外)在内的革兰阳性球菌和除铜绿假单胞菌外的大多数革兰阴性杆菌,均对 TMP-SMX 敏感[343]。葡萄球菌对 TMP-SMX 的敏感性相当稳定,近年的数据报道,超过 99% 的 MSSA 和 92% 的 MRSA 对 TMP-SMZ 仍然敏感[344]。然而,在全球许多地方已有 10%～50% 的肺炎链球菌对 TMP-SMZ 耐药。体外药敏试验显示联合用药对肠球菌的杀菌效果因培养基不同而各异[345]。与其他很多仅能利用胸苷生长的细菌不同,肠球菌能利用胸苷、胸腺嘧啶、外源性叶酸、二氢叶酸和四氢叶酸进行代谢,因此,当培养基包含这些物质时会相应地导致 MICs 升高(升高 25～50 倍)[346]。这也是 TMP-SMX 体内用药时对肠球菌无效的原因。

TMP-SMX 通常对卡他莫拉菌和流感嗜血杆菌有活性,也包括对其产 β-内酰胺酶的菌株有活

性；然而随着肺炎链球菌耐药率的不断增加，该药已不作为急性中耳炎、鼻窦炎、急性支气管炎和肺炎的经验性用药。TMP-SMZ 对急、慢性尿路感染的预防性用药和治疗有很好的效果，但在大多数医院，对其耐药的大肠埃希菌超过了 20%，这降低了该药的效果[118,342,347]。该药已成功用于旅行者腹泻的预防性或治疗性用药[348]。但现在，随着全球很多地方出现 TMP-SMX 耐药的志贺菌属和大肠埃希菌，该药物的应用已受到严重限制。

其他对 TMP-SMX 敏感的细菌还包括布鲁菌属、类鼻疽伯克霍尔德菌、洋葱伯克霍尔德菌、嗜麦芽窄食单胞菌、堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌及瘰疬分枝杆菌。结核分枝杆菌和龟型分枝杆菌通常对它耐药。此外，TMP-SMZ 也是一种可有效治疗某些诺卡菌感染[349]、洋葱伯克霍尔德菌和嗜麦芽窄食单胞菌菌血症、产单核李斯特菌引起的脑膜炎、贝氏等孢子球虫（*Isospora belli*）及环孢子虫属（*Cyclospora* spp.）引起的胃肠炎[170]，以及 Whipple 病的抗菌药物。对免疫受损的宿主（如白血病、获得性免疫缺陷综合征或接受器官移植的患者），TMP-SMX 可用于耶氏肺孢子菌肺炎的预防和治疗[350]。

（四）不良反应

磺胺类可引起恶心、呕吐、头痛和发热。过敏反应包括皮疹、血管炎、结节性红斑、多形性红斑和 Stevens-Johnson 综合征[351]。高剂量的低水溶性磺胺类可能导致结晶尿并出现肾小管磺胺结晶沉积。骨髓毒性包括贫血、白血病或血小板减少症。磺胺类禁用于葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺陷患者，因为该药可能导致患者出现溶血性贫血。磺胺类能增强华法林、苯妥英及口服降糖药的药效。

一般而言，患者对 TMP 耐受性良好。但叶酸缺乏患者长期用药，可能会出现巨幼细胞性贫血、中性粒细胞减少和血小板减少。TMP-SMX 的不良反应可由 TMP 和 SMX 两者之一引起，但由 SMX 引起更常见。约 3% 的患者可发生轻微的胃肠道症状和过敏性皮疹[352]。叶酸缺乏的患者用药后，巨幼细胞性骨髓的改变可能会发展为白血病、血小板减少或全血细胞减少。神经毒性常发生于肾功能不全患者。甲氧苄啶阻断肾细胞顶膜钠通道的作用与保钾利尿药阿米洛利的机制相似，它可导致高钾血症，特别是高剂量使用时[353]。艾滋病患者不良反应的发生率高达 70% 左右[354]。

十四、多黏菌素

多黏菌素（Polymyxin）最先是来自于多黏芽孢杆菌（*Bacillus polymyxa*）的一种阳离子环多肽。它由五种不同的化合物组成（多黏菌素 A～E），其抗菌谱窄且毒性强[355]。目前，仅有多黏菌素 B 和多黏菌素 E（黏菌素）应用于临床。

（一）作用机制

多黏菌素的作用机制类似去垢剂或表面活性剂，是通过作用于细菌细胞膜的磷脂，增加细胞的渗透性，破坏细胞的渗透完整性，使细胞内容物外溢而导致细菌死亡。钙离子能通过干扰药物与细菌细胞膜的结合而降低其杀菌作用。多黏菌素 B 和黏菌素几乎完全交叉耐药，革兰阴性菌可以通过下列方式变得耐药，包括脂多糖水平降低引起外膜蛋白的改变、特异性外膜蛋白减少、细胞包膜的 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 成分降低和脂质改变。此外，多黏菌素 B 外排泵和灭活黏菌素的黏菌素酶的存在而导致的耐药已有报道[356]。MCR 的出现和全球性传播已引起了广泛关注和担忧，MCR 是在 2016 年初报道的一种质粒介导多黏菌素的耐药机制；MCR 介导产生的磷酸乙醇胺转移酶可以将磷酸乙醇胺添加到脂质 A 中，从而降低多黏菌素的作用[357]。

（二）药理学

多黏菌素通常以肠外、口服或局部方式给药。口服和外用较难吸收，肌内注射时很痛。每日静脉注射多黏菌素 B 的总剂量为 2.5 mg/kg 或 25 000 U/kg 可达到血药浓度的峰值 5 μg/ml[358]。多黏菌素 E 有硫酸黏菌素和多黏菌素甲磺酸钠（一种无活性的黏菌素磺甲基前药）两种形式的商品，前者可在肠道产生局部的抗菌效果，后者用于静脉或肌内注射。多黏菌素 B 在血清中的半衰期为 6～7 h，黏菌素为 2～4 h。它们渗透性差，即使在炎症时也难以进入胸腔积液、关节腔积液或脑脊液[359]。多黏菌素甲磺酸钠主要通过肾小球滤过作用排泄，但其用药后产生的游离黏菌素的排出机制尚不清楚[360]。多黏菌素 B 极少通过肾排出，而且可被肾小管大量重吸收，仅 4% 的多黏菌

素 B 能通过肾清除[361]。这些药物不能通过血液透析清除，但可通过腹膜透析少量清除。

0.1% 的多黏菌素常与杆菌肽或新霉素联合用于治疗皮肤、黏膜、眼和耳的感染。这些药物难以通过组织表面而被吸收。然而，当用于灌洗浆膜腔或创腔时，药物全身性吸收量很大，足以导致毒性反应。

(三)抗菌谱

多黏菌素仅对某些革兰阴性菌有抗菌活性，特别是假单胞菌属和不动杆菌属。包括铜绿假单胞菌在内的假单胞菌属及鲍曼不动杆菌的 MIC_{90}s<8 μg/ml。而变形杆菌属、普罗威登斯菌属、沙雷菌属和奈瑟菌属的分离株通常耐药[355]。治疗中的细菌耐药现象常有报道。铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌中分别仅有 93% 和 97% 菌株对多黏菌素敏感[344]。多黏菌素与其他种类抗菌药物之间无交叉耐药，而多黏菌素 B 和多黏菌素 E 有相同的抗菌谱且完全交叉耐药[362]。

多黏菌素联合 TMP-SMX 可协同治疗多耐药的沙雷菌属、铜绿假单胞菌、洋葱伯克霍德菌(*B. cepacia*)和嗜麦芽窄食单胞菌引起的严重感染[63,363]。多黏菌素通常作为挽救性药物治疗由假单胞菌或革兰阴性杆菌引起的严重的、危及生命的感染，而这些病原菌几乎对所有其他抗菌药物均耐药，如产碳青霉烯酶的肠杆菌科[356]。雾化的多黏菌素已成功用于治疗由 MDR 革兰阴性杆菌或铜绿假单胞菌引起的呼吸道定植和医院获得性肺炎，这些患者伴有或不伴有肺囊性纤维化或支气管扩张[358,364]。鉴于多黏菌素 B 和 E 的药代动力学，多黏菌素疗法的完整性一直备受关注[365]。最近的两项小型研究比较了黏菌素与耐药微生物的替代疗法[366-367]。第一组是黏菌素与 plazomicin 的比较，第二是美罗培南-瓦博巴坦与黏菌素最佳治疗方案的比较；这 2 种药物对多耐药性微生物的效果都优于黏菌素，这进一步引起了人们对黏菌素在这类感染中的效用的担忧。

(四)不良反应

多黏菌素主要的不良反应为神经毒性和肾毒性[358]。当血药浓度超过 1～2 μg/ml 时，可发生感觉异常伴面色潮红、眩晕、晕厥、共济失调、言语不清、昏睡或精神错乱[356]。多黏菌素也可有箭毒样作用，阻断神经肌肉的传递。约 20% 接受正常剂量治疗的患者可发生剂量相关性的肾功能不全。皮疹和发热等过敏反应罕见，但快速静脉注射后曾发生过荨麻疹和休克。

十五、氯霉素

氯霉素(Chloramphenicol)是一种最先来自于委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*)的硝基苯环的高效广谱抗菌药物，它用于有特定用药指征的重症患者，但因其众所周知的毒性作用，在美国几乎很少应用。

(一)作用机制

氯霉素为抑菌剂，通过可逆性结合 50 S 核糖体亚基的肽基转移酶，阻碍其转肽作用，阻止肽链延长，从而抑制细菌蛋白质的合成。血清中可达到的治疗剂量能有效杀灭一般的脑膜炎病原体，如肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟菌和流感嗜血杆菌[368-369]。质粒介导的 *cat* 基因所编码的乙酰转移酶可灭活氯霉素，从而使细菌产生耐药[370]。

(二)药理学

氯霉素可通过局部、口服和肠外 3 种途径给药。局部给药不会吸收，但可通过胃肠道快速而完全吸收。口服或静脉给药 1 g 后，2 h 可达到血药浓度峰值 10～15 μg/ml。氯霉素能很好地分布于多种组织和体液中，例如，即使在无脑膜炎症的情况下，脑脊液中的药物浓度也能达到血清中的 30%～50%[371]。氯霉素能迅速通过胎盘屏障，也可存在于母乳中。

氯霉素在肝脏通过糖脂化作用被代谢和失活，在成人体内的半衰期为 4 h。代谢后，有活性的成分(5%～10%)和失活的代谢产物都通过肾脏排泄。为了确保治疗效果并减少毒副作用，必须严密监测氯霉素的血药浓度并使之维持在 10～20 μg/ml。肝衰竭患者因药物的半衰期延长而导致血药浓度升高。因为代谢产物的毒性不如原药，肾功能不全患者不需调整用药剂量。血液透析和腹膜透析不影响血清中的药物浓度。

(三)抗菌谱

氯霉素对多种革兰阳性菌、革兰阴性菌、衣原

体、支原体和立克次体有抗菌活性。大多数革兰阳性需氧和厌氧球菌的 $MIC_{90}s \leq 12.5\ \mu g/ml$[369]。然而，氯霉素通常对 MRSA 和耐甲氧西林的表皮葡萄球菌无活性，对肠球菌的活性不确定。脑膜炎奈瑟菌、流感嗜血杆菌（包括氨苄西林耐药和敏感菌株）和大多数肠杆菌科对该药均敏感。氯霉素对沙雷菌属和肠杆菌属的抗菌活性不一致，假单胞菌属（*Pseudomonas*）的某些菌株通常对其耐药。包括伤寒沙门菌某些血清型在内的沙门菌属对氯霉素敏感，但随着该药使用频率增加，其耐药株也正不断呈现[372]。氯霉素对包括脆弱拟杆菌群某些菌株在内的厌氧菌有抗菌活性，浓度为 10 μg/ml 的氯霉素可抑制几乎所有这些菌株的生长[199]。同时，氯霉素对立克次体属和贝纳柯克斯体也有抗菌活性。

(四)不良反应

氯霉素的不良反应主要是骨髓毒性，可表现为剂量依赖性的骨髓抑制和特发性再生障碍性贫血。药物对造血系统直接的药理学影响导致可逆性骨髓抑制伴贫血、白血病和血小板减少。高剂量（＞4 g/d）、长期用药和过高的血药浓度（＞20 μg/ml）更易导致患者出现这些并发症。骨髓毒性作用的第二种表现是再生障碍性贫血，虽然罕见，却是致命的，其发生与药物剂量无关，确切机制尚不清楚。再生障碍性贫血可发生在氯霉素口服、静脉或局部给药数周到数月之后。

早产儿和新生儿使用氯霉素可导致灰婴综合征，表现为呕吐、腹胀、发绀、低体温和循环衰竭。新生儿的肝功能尚未成熟，肝灭活药物的能力较弱，从而导致这一毒性作用的发生。长期接受氯霉素治疗的患者可发生可逆性视神经炎而出现视力减退。氯霉素偶尔可导致超敏反应，包括皮疹、药物热和全身过敏反应。它也能通过竞争性抑制肝微粒体酶而增强华法林、苯妥英和口服降糖药的药效。

十六、甲硝唑

甲硝唑（metronidazol）是一种 5-硝基咪唑衍生物，于 1959 年首次用于治疗阴道毛滴虫（*Trichomonas vaginalis*）引起的感染。目前，它对厌氧菌和原生动物类寄生虫感染有重要的治疗作用。替硝唑是第二代 5 硝基咪唑化合物，已在美国批准用于治疗滴虫病、贾第虫病和阿米巴病，但由于价格比甲硝唑高很多，所以很少使用。

(一)作用机制

甲硝唑的杀菌作用是缘于其化学结构中的硝基。药物进入敏感微生物细胞后，甲硝唑的硝基在细胞质中可通过硝基还原酶的作用而减少，并产生某些短效而细胞毒性强的中间体化合物或自由基，从而干扰宿主 DNA 的合成[373]。耐药性的产生可能是由于细菌对甲硝唑的摄取减少或诱导产生 5-硝基咪唑还原酶，该酶可清除自由基中间体[374]。

(二)药理学

甲硝唑可通过局部、口服或肠外途径给药。口服给药吸收迅速而完全。口服 250 mg 药物，1 h 后血药浓度可达到峰值 6 μg/ml。静脉给药 7.5 mg/kg 后，可达到血药浓度峰值 20～25 μg/ml。血清中药物的半衰期为 8 h。所有组织和体液中（如脓腔和脑脊液），其药物浓度都可达到治疗剂量，即使在无脑膜炎症的脑脊液中也能达治疗浓度。药物可通过胎盘，也可分泌进入乳汁。甲硝唑主要在肝代谢，60%～80% 通过肾排泄。肝功能受损的患者血浆甲硝唑的清除延迟，需要调整药物剂量。肾功能不全对甲硝唑的药代动力学影响甚微。甲硝唑及其代谢产物均能通过透析完全清除。

(三)抗菌谱

甲硝唑对所有厌氧菌都表现出较强的抗菌活性，包括脆弱拟杆菌群、梭菌属和梭状芽胞杆菌属[197]。甲硝唑是唯一对脆弱拟杆菌（*B. fragilis*）群各成员具有一致杀菌作用的抗菌药物。然而，革兰阳性厌氧球菌的敏感性各异，对这些细菌其 $MIC_{90}s$ 为 16 μg/ml。大多数放线菌属、蛛网菌属（*Arachnia*）和丙酸杆菌属对甲硝唑耐药。多个研究机构报道耐甲硝唑（MICs＞16 μg/ml）的脆弱拟杆菌群出现频率为 2%～5%[18,199]。替硝唑抗厌氧菌活性强于甲硝唑[375]。硝基咪唑对包括肠杆菌科在内的需氧菌无抗菌活性。

甲硝唑可有效治疗艰难梭状芽胞杆菌引起的抗菌药物相关性结肠炎[11]，其疗效与口服万古

霉素治疗轻度或中度感染相当。然而，近年的数据显示，在治疗严重疾病时，甲硝唑的效果不如万古霉素[135]。甲硝唑也可用于治疗软组织多重感染，以及由需氧菌-厌氧菌导致的腹腔和盆腔混合感染。

甲硝唑和替硝唑对阴道毛滴虫、蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*)和溶组织内阿米巴等原生动物有抗菌活性，是滴虫病、贾第虫病和包括阿米巴肝脓肿在内的肠道侵袭性阿米巴病的治疗性药物[170,376]。

(四)不良反应

患者对甲硝唑通常耐受性良好，不良反应少见，可出现轻微的胃肠道症状，如恶心、腹部绞痛和腹泻。口服给药时有让人不愉快的金属味道。长期使用甲硝唑与神经病变有关，在少数情况下会引起中枢神经系统的剧烈改变[377]。接受甲硝唑治疗时，饮酒可增强华法林的药效，延长凝血酶原时间并导致双硫仑样反应。

虽然甲硝唑对小鼠和大鼠有致癌作用，但没有证据显示它对人类也有致癌作用。然而，妊娠期间，特别是初期妊娠时应禁用此药，哺乳期母亲也应禁用。

十七、利福霉素类

利福霉(Rifamycin)素类是地中海链霉菌(*Streptomyces mediterranei*)产生的一种大环化合物。利福平是一种来自于利福霉素 B 的半合成抗菌药物，是这类药物中首个有效的抗结核药并于 1968 年用于临床。与之相近的化合物利福布丁是一种来自于利福霉素 S 的衍生物，也是一个有效的抗分枝杆菌的抗菌药物，特别是抗鸟分枝杆菌(*M. avium*)复合群[378]。利福布丁的半衰期比利福平长，且研究显示它有效缩短了结核分枝杆菌潜伏感染的疗程[379]。利福昔明是利福平的一种衍生物，比利福平多一个吡啶咪唑环，口服给药不能吸收，可用于治疗单纯性的旅行者腹泻，但在美国常用于治疗肝性脑病。

(一)作用机制

利福霉素类通过与细菌 DNA 依赖性的 RNA 聚合酶形成稳定的复合体，抑制 DNA 转录的起始，从而发挥其杀菌作用[380]。哺乳动物 RNA 合成不受影响，这是因为哺乳动物中相应的酶对该药的敏感性较低。单一使用利福平治疗容易通过单步突变引起 RNA 聚合酶的改变而导致细菌耐药。

(二)药理学

利福平口服给药易吸收，口服 600 mg 后，2～4 h 血药浓度可达到峰值 5～10 μg/ml。也可用于肠外给药。利福平在肝中通过去乙酰基作用转变为活性代谢物，通过胆汁排出，并进入肠肝循环。在血清中的半衰期通常为 1.5～5.0 h。利福平在体内各组织和体液中分布良好，能够达到或超过血清中的浓度。在脑膜出现炎症时，利福平在脑脊液中的浓度最高。利福平能进入吞噬细胞并能杀灭寄生在吞噬细胞内的微生物[381]，还能穿过胎盘屏障。30%～40% 的药物通过尿排出，药物不在肾功能受损患者的体内蓄积。血液透析和腹膜透析不能清除药物。严重肝功能不全的患者应调整剂量。

由于利福昔明的化学结构上有一个额外的吡啶咪唑环，因而口服该药时很难被吸收。对健康志愿者和肠黏膜损伤者的研究显示，>99% 的利福昔明存在于粪便中，<1% 的口服剂量的药物可在血浆中被检测到[382]。口服利福昔明 400 mg，每天 2 次，第 3 天时粪便中平均药物浓度可达到 8000 μg/g[383]。

(三)抗菌谱

除了众所周知的抗分枝杆菌的作用外[384]，利福平还具广谱的抗菌活性。对于敏感的革兰阳性球菌，如 MRSA 在内的葡萄球菌、链球菌和厌氧球菌，该药有杀菌作用，药敏试验的 MICs 通常为 0.01～0.50 μg/ml。利福平也是联合治疗严重慢性葡萄球菌感染的重要药物之一[385]。然而，利福平对肠球菌只有抑菌作用，一般 MICs < 16 μg/ml[280]。

淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌和流感嗜血杆菌，即使是产 β-内酰胺酶的菌株，也对利福平敏感。利福平常被用于脑膜炎球菌和流感嗜血杆菌血清型 b 型引起的脑膜炎的预防[386]。肠杆菌科细菌的 MICs≤12 μg/ml，而黏质沙雷菌和铜绿假单胞菌的 MICs 值更高[280]。除氟喹诺酮以外，利福平

是对嗜肺军团杆菌和其他军团菌属最有活性的药物之一，MICs≤0.03 μg/ml。利福平可进入吞噬细胞的细胞质，可抑制胞内感染菌布鲁菌属和贝纳特柯克斯体的生长[127]，它常联合用于治疗这些病原体引起的感染。正如在其他很多细菌中发现的那样，在体外试验中，虽然贝纳特柯克斯体属的某些株对利福平敏感，但利福平单用时常可快速诱导耐药的产生。

利福昔明对肠道病原体具有广谱的抗菌活性，包括肠毒素性和肠聚集性大肠埃希菌的菌株、气单胞菌属、志贺菌属和沙门菌，其 MIC_{90}s 为 4～16 μg/ml[382,387]。虽然利福昔明对空肠弯曲菌(MIC_{90} 为 512 μg/ml)、小肠结肠炎耶尔森菌(MIC_{90} 为 128 μg/ml)、梭状芽胞杆菌(MIC_{90} 为 128 μg/ml)和幽门螺杆菌(MIC_{50} 为 4 μg/ml)的活性低，但利福昔明在胃肠道中的浓度能够达到比 MICs 值高 10 倍的水平。利福昔明已成功用于治疗和预防单纯的旅行者腹泻[388]。利福昔明治疗艰难梭状芽胞杆菌感染时并不比对照药物有显著的优势。艰难梭状芽胞杆菌对利福昔明迅速出现耐药已有报道，其治疗艰难梭状芽胞杆菌的作用仍不清楚[135]。

(四)不良反应

利福平有很多不良反应，包括胃肠道不适和过敏反应，如药物热、皮疹和嗜酸性粒细胞增多。它常导致痰、泪液、尿和汗液呈橘黄色无损伤改变。间断给药数月后，约 20% 患者可出现流感样综合征，如发热、寒战、关节痛和肌痛[389]。其免疫反应可能与溶血性贫血、血小板减少和肾衰竭相关。利福平诱发肝炎的发生率<1%，当与异烟肼联用治疗结核时，可增加其诱发肝炎的概率。利福平是细胞色素 P450 肝药酶的一种高效诱导剂，其他利福霉素也有此作用但效果甚弱。该特性导致一系列显著的药物-药物相互作用，而使得利福霉素类用于治疗变得更复杂。

利福昔明最常见的不良反应是头痛、恶心、腹痛和疲劳。过敏性皮炎、皮疹、血管神经性水肿、荨麻疹和瘙痒等过敏反应少见，对利福平过敏者也禁用利福昔明[382]。然而，与利福平不同，临床上利福昔明不会发生与其他药物间的相互作用，这是因为利福昔明在全身不被广泛吸收。

十八、呋喃妥因

呋喃妥因(Nitrofurantoin)属于由初级硝基基团与杂环连接而成的一类复合物，仅用于治疗人类尿路感染[222]。

(一)作用机制

呋喃妥因通过多重机制发挥抗菌效果。呋喃妥因在高浓度时，能被细菌的硝基还原酶转化成高活性亲电子的中间体，后者能非特异性地与细菌核糖体蛋白和 rRNA 结合，从而导致细菌 DNA、RNA 和蛋白质的合成终止[390]。呋喃妥因在接近敏感菌 MICs 浓度时，可抑制关键的细菌酶(β 半乳糖苷酶和半乳糖激酶)的诱导合成，在药物未降低活性时可干扰细菌代谢[390]。

(二)药理学

呋喃妥因具有微晶体和粗晶体两种形式。口服给药，胃肠道吸收良好。常规口服用药时，血清和多数组织中可监测到极微量的药物。血清中的半衰期约为 20 min，2/3 的药物能在各种组织中快速代谢并灭活，另外 1/3 可通过尿以原药的形式排出。常规治疗剂量可使肾功能正常患者尿中药物的浓度达到 50～250 μg/ml。大部分药物在碱性尿中常以电离的形式存在，降低了其抗菌活性。当肌酐清除率<60 ml/min 时，药物可在血清中蓄积。药物可通过血液透析清除。尿毒症患者使用此药时可能增加其全身性毒副作用。呋喃妥因禁用于有严重肾损伤和肝衰竭的患者。

(三)抗菌谱

呋喃妥因对革兰阳性菌和革兰阴性菌有广谱的抗菌活性，尤其是尿路常见致病菌。它对各种革兰阳性球菌有抗菌活性，如金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、腐生葡萄球菌和粪肠球菌，MICs 为 0.5～64.0 μg/ml[236,344]。肺炎链球菌、化脓性链球菌和棒状杆菌属虽然对此药敏感，但这些病原体很少引起尿路感染。大约 90% 的大肠埃希菌和许多其他大肠菌群均对呋喃妥因敏感，且 MICs<32 μg/ml。然而，仅 1/3～1/2 的肠杆菌属和克雷伯菌属的分离株对呋喃妥因敏感。假单胞菌属和多数变形杆菌属对呋喃妥因耐药。敏感

株很少在治疗期间诱导为耐药株。根据 IDSA 指南，呋喃妥因可作为膀胱炎的一线用药[222]。

(四)不良反应

呋喃妥因的主要不良反应为胃肠道刺激症状，如厌食、恶心和呕吐。腹泻和腹部绞痛也可能发生。也曾出现过药物热、寒战、关节痛、皮疹和狼疮样综合征等过敏反应[391]。肺部疾病是呋喃妥因使用相关的最常见的严重不良反应。该药应用数日后可发生急性肺炎伴发热、咳嗽、呼吸困难、嗜酸性粒细胞增多，以及通过胸部 X 线片能观察到的肺浸润[391]。这些免疫介导的反应在老年患者中更多见，停药后可迅速恢复正常。连续治疗 6 个月或更长时间可导致慢性肺源性反应伴间质性肺炎的患者发生不可逆的肺纤维化损伤[392]。

肾衰竭患者比其他患者更易出现多发性周围神经病变的不良反应。还可发生溶血性贫血、巨细胞性贫血和骨髓抑制伴白血病。极少有关于肝毒性反应如胆汁淤积性黄疸和慢性活动性肝炎的报道[393]。

十九、磷霉素

磷霉素(Fosfomycin)是于 1969 年首次从链霉菌属(*Streptomyces*)中分离出来的一种磷酸衍生物[394]。虽然磷霉素经过不断研发已经用于治疗 MDR 感染性疾病，但在美国也常单独用于治疗敏感菌引起的单纯性尿路感染[222,395-396]。

(一)作用机制

磷霉素是一种杀菌剂，可抑制 UDP-N-乙酰葡糖胺烯醇式丙酮酸转移酶(MurA)的活性，MurA 是一种胞质酶，在肽聚糖合成起始时催化尿苷二磷酸-N-乙酰胞壁酸的形成[394]。磷霉素与其他抗菌药物很少有交叉耐药性，这可能是因为其独特的化学结构和作用位点所造成的。细菌对磷霉素的耐药可由 3 种机制造成：①细菌转运药物至胞内的蛋白(GlpT 和 UhpT)的结构基因或调节基因的突变。②质粒介导的药物灭活酶(FosA)的产生。③靶酶 MurA 的过表达[394]。

(二)药理学

磷霉素最初以钠盐和钙盐的形式通过口服或静脉给药。在美国，磷霉素有口服的水溶性氨丁三醇盐，口服给药后可快速吸收并转化为游离的磷霉素。磷霉素的口服生物利用度为 35%～40%，其平均半衰期为 5.5 h，主要以原药的形式通过尿排泄[394]。单次口服用药 3 g，2 h 后可达到血药浓度峰值(22～32 μg/ml)，4 h 后尿中可达到峰值(1000～4400μg/ml)，并且尿中的高浓度(>128 μg/ml)可维持 24～48 h，足以抑制大多数尿路病原菌。当药物与食物或抗蠕动药物一同服用时，尿中药物浓度达峰值的时间将延迟，且峰值变低。当患者肾功能受损时(肌酐清除率<30 ml/min 时)，血清中的峰浓度将升高，尿排泄将减少，并且尿中的药物浓度也随之降低。

磷霉素不能与血浆蛋白结合，它在体内各组织和体液中分布广泛，包括肾、前列腺和精囊，该药从这些部位清除缓慢。虽然能透过胎盘屏障，但有明确使用指征的孕妇也可安全使用。

(三)抗菌谱

磷霉素对大多数分离于下尿路感染患者的革兰阳性病原菌和革兰阴性病原菌具有广谱的抗菌活性。目前，FDA 仅批准磷霉素用于治疗由粪肠球菌和大肠杆菌引起的非复杂性尿路感染的女性患者。浓度小于 64 μg/ml 的磷霉素通常能抑制大肠埃希菌、沙雷菌属、克雷伯菌属、枸橼酸杆菌属、肠杆菌属、金黄色葡萄球菌和肠球菌[394]。尿路感染分离出的包括产 ESBL 大肠埃希菌在内的 MDR 细菌常对磷霉素敏感[397]。当磷霉素的浓度接近其 MICs 时具有杀菌作用，且该浓度<2 倍 MICs。对这些病原菌，其抗菌活性比甲氧苄啶和萘啶酸要强，而与诺氟沙星和复方磺胺甲噁唑的活性相当[394]。当以 128 μg/ml 为折点浓度时，分别有 60%、20% 和 80% 的假单胞菌属、摩根摩根菌和腐生葡萄球菌对磷霉素敏感[398]。多剂量用药可导致细菌对磷霉素的耐药性快速出现，这主要是因为染色体突变或罕见的可移动性元件的获得而导致耐药的产生。然而，磷霉素与其他抗生素的交叉耐药少见[394]。全球许多地区以磷霉素治疗产 ESBL 大肠埃希菌尿路感染，这也导致其耐药性迅速增加[399]。磷霉素的体外抗菌活性受到培养基成分和条件的影响[394,398]。琼脂和肉汤稀释法药敏试验推荐在使用的培养基中添加 25 μg/ml的葡萄糖-6-磷酸，此时体外抗菌活性将

增强，与体内抗菌活性更接近。CLSI 标准中，使用纸片扩散法药敏试验检测粪肠球菌和大肠埃希菌时，培养基中需加入 200 μg 磷霉素氨丁三醇和 50 μg 或 100 μg 葡萄糖-6-磷酸。

(四)不良反应

最常见的不良反应为轻度、自限性的胃肠道紊乱，主要是腹泻，其发生率为 3%～5%。其他轻微的不良反应包括头痛、晕厥、皮疹和阴道炎。

二十、莫匹罗星

莫匹罗星（Mupirocin）以前称为假单胞菌酸 A，是一种来自荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens*）发酵产物的局部用抗菌药物[400]。该药化学结构中含有一个 9-羟基壬酸基团，能够抑制氨酰 tRNA 合成酶的活性，从而抑制细菌蛋白质的合成[401]。低水平耐药（MICs 为 4～256 μg/ml）源于细菌染色体 *ileS* 基因突变导致的合成酶的改变，而高水平获得性耐药（MICs≥512 μg/ml）源于由质粒介导的 *mupA* 和 *mupB* 基因，这些基因编码额外的氨酰 tRNA 合成酶[402]。

莫匹罗星最开始用于表皮软组织的感染，特别是葡萄球菌引起的感染。莫匹罗星在美国已制成含量 2% 的软膏剂或油剂。局部给药后，<1% 可吸收入全身，尿和粪便中检测不出此药。创伤性伤口和包扎疗法可使药物渗透至深层真皮。药物有较高的蛋白结合率（95%），且在血清中出现时，该药的活性降低。其活性在中度酸性 pH 时最高，且无接种效应[403]。莫匹罗星在皮肤中缓慢代谢分解为无活性的单胞菌酸。

体外实验表明，莫匹罗星主要对包括 MRSA 在内的金黄色葡萄球菌及凝固酶阴性的葡萄球菌等革兰阳性球菌有活性，MIC_{90}s<0.5 μg/ml[404]。莫匹罗星的广泛使用可诱导葡萄球菌的耐药株出现[405-407]。浓度小于 1 μg/ml 的莫匹罗星即可抑制大部分链球菌（包括肺炎链球菌及 A 组、B 组、C 组、G 组 β-溶血性链球菌和草绿色链球菌）的生长。肠球菌、棒状杆菌属、丹毒丝菌属、痤疮丙酸杆菌、革兰阳性厌氧菌和多数革兰阴性菌对莫匹罗星耐药。然而，流感嗜血杆菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、卡他莫拉菌、百日咳杆菌和多杀巴斯德菌对莫匹罗星敏感，MICs 为 0.02～0.25 μg/ml。莫匹罗星与其他抗菌药物之间不存在交叉耐药性。莫匹罗星在临床上可有效治疗葡萄球菌和链球菌引起的皮肤脓疱病、毛囊炎和烧伤创面感染[405]。虽然，莫匹罗星已成功用于治疗鼻腔携带的包括 MRSA 在内的金黄色葡萄球菌[409]，但其仍然可能不适于防治院内获得性的金黄色葡萄球菌感染[410]。莫匹罗星全身性不良反应未见报道。局部刺激性反应，如皮肤烧灼感、叮咬感、瘙痒和皮疹，可能是药膏中聚乙二醇刺激产生的。

附录 血清中抗菌药物的大概浓度

附表中抗菌药物的大概浓度摘自各类报道和出版物。很多因素可以影响个体患者体内抗菌药物的水平，如患者自身的遗传差异、身体素质、给药剂量及用药方式。这些值也受所用检测方法的影响。因此，表中的这些浓度只是一个大概值，临床医生应该根据自身对患者和药物的评估、美国 FDA 批准的说明书或其他有用的资源制订治疗方案。

附表 血清中抗菌药物的大概浓度

抗菌药物	血清中的半衰期(h)	单位剂量[a]	用药后血清中药物的平均峰浓度(μg/ml)[b]		
			p. o.	i. m.	i. v.
阿米卡星	2.0～2.5	7.5 mg/kg		15～20	20～40
阿莫西林	1	500 mg	6～8		
阿莫西林-克拉维酸	1.3,1.0	250 mg,125 mg	3.3,1.5		
		500 mg,125 mg	6.5,1.8		
		875 mg,125 mg	11.6,2.2		
		1000 mg,62.5 mg	17,2.1		
氨苄西林	1.1	500 mg	2.5～5	8～10	

（续 表）

抗菌药物	血清中的半衰期(h)	单位剂量[a]	用药后血清中药物的平均峰浓度(μg/ml)[b]		
			p. o.	i. m.	i. v.
氨苄西林-舒巴坦	1.1,1.0	1 g			40
		3 g			120,60
		1.5 g			18,13
阿奇霉素	48	500 mg	0.4		3.5
氨曲南	1.7	1 g		45	90～160
头孢克洛	0.6	500 mg	16		
头孢羟氨苄	1.5	500 mg	10		
头孢唑林	1.8	1 g		65	185
头孢地尼	1.7	300 mg	1.6		
头孢妥仑	1.6	200 mg	3.1		
		400 mg	4.4		
头孢吡肟	2	1 g		30	82
头孢克肟	3～4	400 mg	3.5		
头孢哌酮	2	1 g		65～75	153
头孢噻肟	1	1 g		20	40～45
头孢替坦	3.0～4.5	1 g		50～80	160
头孢西丁	1	1 g		20～25	55～110
头孢匹罗[c]	2	1 g		45	85
		2 g			180
头孢泊肟	2.5	200 mg	2.3		
头孢丙烯	1.5	500 mg	10.5		
头孢洛林	2.6	600 mg		8.5	21
头孢他啶	2	1 g		40	70
头孢布烯	2.5	400 mg	15		
头孢吡普[c]	3～4	500 mg			44
		750 mg			60
Ceftolozane	3	1 g			70
头孢曲松	6～9	500 mg		40～45	
		1 g			150
头孢呋辛	1.5	750 mg		27	50
头孢呋辛酯	1.5	500 mg	9		
头孢氨苄	0.9	500 mg	18		
塞红霉素[c]	5	150 mg	0.2		
		300 mg	0.5		
氯霉素	4	1 g	10～18		10～15
环丙沙星	5～6	400 mg			4.5
		500 mg	3.0		
		500 mg XR	1.6		
		750 mg	4.0		
		1000 mg XR	3.1		
克拉霉素	5～7	250 mg	1～2		
		500 mg	3～4		
		1000 mg XL	2～3		

（续 表）

抗菌药物	血清中的半衰期(h)	单位剂量[a]	用药后血清中药物的平均峰浓度(μg/ml)[b]		
			p. o.	i. m.	i. v.
克林霉素	2.5	300 mg	3	6	
		600 mg			10～12
氯唑西林	0.5	500 mg	10		
多黏菌素 E 甲磺酸钠	2	150 mg		5～6	
达巴威新[c]	149～198	1 g			285
达托霉素	9	4 mg/kg			70
		6 mg/kg			82
德拉沙星	3.7	300mg			9
	6	450mg	7.2		
地美环素	12	300 mg	1～2		
双氯西林	0.5～0.7	500 mg	15		
多西环素	18～22	100 mg	2.5		4
厄他培南	4	1 g		70	155
红霉素	1.5	500 mg	2～3		
		1 g			10
磷霉素	5.7	3 g	25		
		50 mg/kg			275
夫西地酸	13～19	500 mg	25～30		50
加替沙星	7	400 mg	4		4.5
吉米沙星	7～8	320 mg	1.8		
庆大霉素	2～3	1.5 mg/kg	4～6		4～8
亚胺培南	1	500 mg			25～35
左氧氟沙星	6～8	500 mg	5.5		6.5
		750 mg	8.5		12
林可霉素	5	500 mg	3.5		
		600 mg		10	16～21
利奈唑胺	5	400 mg	11		
		600 mg	13		13
美罗培南	1	500 mg			25～35
甲硝唑	8	500 mg	12		20～25
米诺环素	14～16	100 mg	1		
莫西沙星	12	400 mg	4.5		4.5
萘夫西林	0.5	500 mg			5～8
		1 g			20～40
萘啶酸	1.5	1 g	20～50		
呋喃妥因	0.3	100 mg	<2		
诺氟沙星	3.3	400 mg	1.5		
氧氟沙星	5	400 mg	4		
奥利万星[c]	136～274	0.5 mg/kg			6.5
		200 mg			25～35
奥硝唑	13	500 mg	10		20
苯唑西林	0.5	500 mg	4～6	14～16	
		1 g			40

（续　表）

抗菌药物	血清中的半衰期(h)	单位剂量[a]	用药后血清中药物的平均峰浓度(μg/ml)[b]		
			p. o.	i. m.	i. v.
培氟沙星[c]	10	400 mg	3		5.5
青霉素 G	0.5	500 mg	1.5～2.5		
水剂青霉素		1×10^6 U		8～10	10
苄星青霉素		1.2×10^6 U		0.1～0.153	
普鲁卡因青霉素		1.2×10^6 U			
青霉素 V	0.5	500 mg	3～5		
哌拉西林	1.1	2 g			36
		4 g			240
哌拉西林-他唑巴坦	1.1,1.0	3.375 g			242,24
		4.5 g			298,34
多黏菌素 B	6～7	2.5 mg/kg			5
奎奴普汀-达福普汀	1.00,0.75	7.5 mg/kg			3,7.5
利福平	2～5	600 mg	7～9		10
链霉素	2～3	1 g		25～50	
磺胺嘧啶	17	2 g	100～150		
磺胺多辛	150～200	1 g	50～75		
磺胺甲二唑	4～7	2 g	60		
磺胺甲噁唑	10～12	1 g	40		
泰地唑胺	12	200 mg	2.2		3
替考拉宁[c]	45	200 mg		7	
		400 mg			20～40
特拉万星	6～8	7.5 mg/kg			88
		10 mg/kg			108
泰利霉素	9～10	800 mg	2		
四环素	8	500 mg	4		8
替加环素	36	50 mg			0.8
替硝唑	12～14	2 g	48		
妥布霉素	2～2.8	1.5 mg/kg		4～6	4～8
甲氧苄啶	10～12	100 mg	1		
甲氧苄啶-磺胺甲噁唑		160 mg,800 mg	3,46		9,106
万古霉素	6	500 mg			20～40

注：[a] XR 或 XL，缓释剂。[b] p. o. 为口服；i. m. 肌肉注射；i. v. 为静脉给药（静脉给药后的血药浓度为 30 min 后的测量值）。如果有 2 个值，它们对应于剂量栏中的次序。[c] 在美国未获临床使用的许可

参考文献请扫二维码查阅

第 71 章　抗菌药物耐药机制

PATRICIA A. BRADFORD，MARIANA CASTANHEIRA

（李荷楠　译；刘文恩、俞云松　审校）

一、引言

（一）抗菌药物耐药性的产生和传播

细菌通过多种途径形成对抗菌药物的耐药性。当任何病原体发生突变并产生耐药性时，它会迅速产生大量的耐药子细胞。暴露于抗菌药物后产生的突变体倾向于以最小的适应性代价获得耐药性的机制。也就是说，耐药性负担最小的菌株将存活。这种提高的存活率还可以包括增加毒力。抗菌药物耐药性使细菌感染的治疗变得复杂，有时需要使用多种抗菌药物进行治疗，延长疗程和长期住院。美国疾病控制与预防中心（CDC）于 2013 年发表了有关美国抗菌药物耐药性的第一份报告，内容涉及细菌感染治疗中的持续威胁[1]。在此报告中，CDC 估计在美国至少 200 万人发生了耐药菌的严重感染，并且至少 23 000 例患者因这些耐药菌引起的感染死亡。重要的是要了解细菌病原体耐药性产生的机制，并在耐药性发生时识别这种耐药性。

抗菌药物耐药表型的出现与任何相应的抗菌药物的使用是直接相关的。当一种有效的抗菌药物消除对其敏感的病原体时，耐药变异体很快就填补了环境或患者微生物组中的空白。一旦之前表现为敏感的菌种中出现耐药表型，其传播的速度和效率受许多不同因素影响，包括基因在可移动遗传元件上的定位，耐药性的表达水平，生物体对耐药机制的耐受力、与其他基因的关联、原发定植部位等。耐药基因传播的快速性和完全性往往是不可预测的。例如，青霉素投入临床应用后不久就出现了葡萄球菌 β-内酰胺酶基因（介导对青霉素耐药）的报道，而现在这种耐药机制几乎普遍存在于医院内和社区感染的葡萄球菌中。直到 20 世纪 80 年代初，该基因才在肠球菌属中被发现，但并没有在该菌属间广泛传播。相反，万古霉素耐药基因在屎肠球菌广泛存在，在金黄色葡萄球菌中却仍极为罕见。

抗菌药物耐药性传播的一个重要原因是医院内外均未遵循适当的感染控制技术。在各个医院内部，甚至在整个城市中流行的甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *S. aureus*，MRSA）被认为具有克隆相关性，这种相关性可以通过基因技术，如脉冲场凝胶电泳（pulsed-field gel electrophoresis，PFGE）、多位点序列分型（multilocus sequence typing）和葡萄球菌蛋白 A 分型来检测[2]。这些引发问题的病原体很可能是通过短期或长期定植于医护人员，进而导致了患者间的传播[3]。金黄色葡萄球菌的主要定植部位是前鼻孔。鼻孔定植有利于耐药菌通过气溶胶传播，尤其是在定植的工作人员发生上呼吸道病毒感染期间。医护人员手和鼻的频繁接触及洗手习惯较差，也有助于该菌的直接传播。金黄色葡萄球菌定植于患者的临床后果是显著的。有研究表明，在高风险时期，如手术后，MRSA 定植和随后的感染之间具有相关性[4]。

虽然抗菌药物耐药主要是医院内的问题，但耐药菌也可在社区内传播，包括日间护理中心和疗养院等[5-6]。冬季病毒性上呼吸道感染流行，耐药菌传播也可能会在此时达到高峰[7]。病毒性上呼吸道感染通过 2 种方式增加耐药菌的传播：①对于已被耐药菌定植的患者，病毒感染可能会增加耐药菌的传播量；②对于未被耐药菌定植的患者，病毒感染会增加患者接受抗菌药物治疗的概率，使得耐药菌定植的可能性增加。疗养院是耐药菌传播易发区，其原因多样，包括大部分人体

质弱、频繁往返于三级医院，为了防止因感染的住院而频繁使用抗菌药物等。

当首次发现社区相关的MRSA（community-associated MRSA，CA-MRSA）感染时，调查通常会发现患者有近期住院，与住院患者的密切接触，或以前的抗菌药物治疗的历史。但是，也有一些明显的例外。1980—1981年，在底特律没有住院史的人群中暴发了MRSA感染[8]。这些患者大多数是注射吸毒者。底特律暴发的根源尚未确定，但可以假定频繁地共用针头是社区的传播方式。20世纪90年代后期，4名没有已知危险因素的MRSA感染的美国原住儿童意外死亡，引起了对CA-MRSA新的关注[9]。这些CA-MRSA菌株在微生物学上往往与医院相关的MRSA菌株不同，并且通常比医院相关的MRSA菌株对常用的抗菌药物更敏感。属于PFGE类型USA300的CA-MRSA的常见克隆最初仅在美国流行。但是，它现在已经在北美、拉丁美洲和加勒比海地区广泛传播[10-12]。

耐药细菌产生和传播的最后一个重要来源是抗菌药物在农业上的使用。目前公认的是，食用动物中的抗菌药物使用与污染食物并感染人类的细菌的耐药性产生有关，主要是沙门菌属（*Salmonella*）和弯曲菌属（*Campylobacter*），同时也与耐药性基因转移到人体内的相应细菌有关，如肠球菌属（*Enterococcus*）[13]。有充足证据表明，大肠埃希菌对环丙沙星的高耐药率与氟喹诺酮类药物在家禽中的使用有关[14]。另外，20世纪90年代，携带*vanA*基因的万古霉素耐药肠球菌在欧洲暴发，基本可以肯定是与在食用动物中使用糖肽类抗菌药物阿伏帕星（avoparcin）作为生长促进剂有关[15]。

（二）耐药性的遗传基础

细菌对抗菌药物耐药性的产生可通过以下3个主要途径：抗菌药物靶标的修饰，由于渗透性降低或外排引起的细胞内抗菌药物浓度降低，药物的酶失活。在某些情况下，某些菌种的所有成员可能对特定抗菌药物具有耐药性。例如，革兰阴性非发酵菌嗜麦芽窄食单胞菌的所有分离株均表达染色体编码的金属β-内酰胺酶。因此，对亚胺培南和其他碳青霉烯类的耐药性可以用作鉴定该细菌的诊断工具。敏感菌株也可以通过遗传突变或获得带有耐药基因的外来DNA来产生耐药性。

1. 天然耐药（innate resistance）细菌的选择　抗菌药物的使用会破坏正在治疗的患者的微生物组，这可能导致耐药细菌的选择和过度生长。结果，由于在该菌种中自然发生的耐药性，整个细菌病原体物种可能会在抗菌药物压力下进行选择。反过来，医院或其他附近人群，例如，日间护理中心或长期护理机构中的人，也会受到影响。例如，在20世纪80年代和90年代，肠球菌作为条件致病菌的增加与氟喹诺酮类和头孢菌素类抗菌药物的引入和使用增加有关，因为肠球菌对这些抗菌药物天然耐药[16]。同样，氟喹诺酮治疗与留置中心导管的血液病患者葡萄球菌和链球菌感染的发生率较高相关[17]。在革兰阴性病原体中，随着碳青霉烯类抗菌药物的使用增加，鲍曼不动杆菌和嗜麦芽窄食单胞菌在许多重症监护病房中变得越来越普遍，尤其是在机械通气患者中[18-19]。这些新治疗方法的引入导致了意想不到的结果，将一些常见的医院感染病原体转变为更具天然耐药的物种。

2. 突变引起的耐药　随着细菌的生长，染色体和质粒DNA的复制过程非常容易发生碱基掺入错误。这些导致碱基替换的错误是随机发生的，每个基因的频率约为10^{-9}[20]。甚至一个氨基酸的替换都可以极大地改变基因产物的功能。例如，β-内酰胺酶SHV-1第238位的丝氨酸被甘氨酸替换，可转变为第一个超广谱β-内酰胺酶（extended-spectrum β-lactamase，ESBL）SHV-2，产生对广谱头孢菌素的耐药性[21]。除了这些随机点突变外，复制错误还可能导致小片段基因的缺失或插入。这些突变中的每一个都通过改变药物靶标，导致药物相关的酶失活，或外排或摄取的变化来干扰抗菌药物与细菌的相互作用。其中一些基因通过插入序列引入被失活。例如，只有在*ccrA*基因的上游插入了插入序列时，脆弱拟杆菌才表达金属β-内酰胺酶[22]。暴露于抗菌药物不会引起突变，而是选择具有预先存在突变的菌株，这些突变允许细菌在存在抗菌药物的情况下存活。

在药物靶标或抗菌药物修饰酶中发生的大多数突变仅影响单个抗菌药物类别。但是，外膜孔蛋白（outer membrane porin protein，OMP）的基因突变允许抗菌药物通过被动扩散穿透外膜，或

者外排系统的基因突变将多种类型抗菌药物，以及其他细胞毒素例如染料排出体外会极大地影响细菌对多种类型抗菌药物的敏感性[23]。引起抗菌药物耐药性的细菌病原体中突变的维持完全取决于该突变是否影响该生物的适应性或毒力。如果耐药突变体以高频率出现，并且仍然能够复制并引起疾病，它们可以在细菌群体中获得立足之地，并通过继续使用该药物被进一步选择[24]。在某些菌种发生突变耐药之后，20 世纪 80 年代和 90 年代引入的几种抗菌药物的效用有所降低。葡萄球菌对氟喹诺酮类药物的耐药性产生是由于 NorA 介导的外排的上调[25]。另一个示例是亚胺培南的使用，这导致菌群选择了缺少 OprD 孔蛋白的铜绿假单胞菌菌株，后者提供了碳青霉烯类抗菌药物通过外膜特有的孔通道[23]。有趣的是，金黄色葡萄球菌和肠球菌属的 23S rRNA 的结构域 V（利奈唑胺的结合位点）的修饰导致了近期细菌对利奈唑胺的耐药，但尚未导致临床分离株的广泛耐药[26]。

3. DNA 转移获得的耐药性 细菌之间的 DNA 转移主要是通过质粒进行的，其中一些质粒是可自我转移的，因为它们带有启动质粒直接转移到另一种细菌的基因。许多质粒很大，并且能够容纳多个耐药基因。这些大的可转移质粒是传播耐药基因的理想载体，因为它们可以携带并表达多种耐药决定簇，并且经常携带能够促进其向另一细菌转移的基因。在质粒内，耐药基因通常由转座子携带，转座子可以在质粒之间转移耐药决定簇或将耐药决定簇转运进染色体中或从染色体中移出[27]。另外，耐药细菌通常包含整合子，其具有在单个启动子后获得并表达耐药决定簇的能力。它们广泛分布于革兰阴性细菌中，并存在于质粒和转座子中[27]。在整合子中发现了很多不同的耐药决定簇，包括甲氧苄啶和磷霉素的耐药基因，介导喹诺酮耐药的外排基因和介导的碳青霉烯耐药的金属 β-内酰胺酶基因[28-30]。

质粒、转座子和整合子在细菌病原体中的传播导致了"基因的流行"[24]。例如，质粒介导的 β-内酰胺酶 TEM-1 最早报道见于 1965 年在希腊一名患者中分离的大肠埃希菌，但此后在全球范围内传播到多个物种。在高达 60%的肠杆菌科临床分离株，少数铜绿假单胞菌分离株及高达 50%的流感嗜血杆菌和淋病奈瑟菌中都发现了该基因[31]。可能有多种因素决定了可移动基因是否会广泛传播，但这些因素尚未阐明。例如，β-内酰胺酶 TEM-2 与 TEM-1 的区别仅在于单个氨基酸替代，并且具有相同的耐药谱。在相似种类的质粒和转座子上也发现了 TEM-2。但是，在每个区域 TEM-2 流行程度都比 TEM-1 至少要低 10 倍[31]。

现在在质粒、整合子和转座子上发现的许多耐药基因被认为起源于其他细菌的染色体，这种现象在质粒介导的 β-内酰胺酶中得到了充分证明。SHV 型 β-内酰胺酶来源于肺炎克雷伯菌的染色体 β-内酰胺酶。肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中表达的质粒编码 AmpC 酶，与一些细菌的染色体 AmpC 基因编码产物几乎相同，包括阴沟肠杆菌（ACT-1 和 MIR-1），弗氏柠檬酸杆菌（CMY 型），蜂房哈夫尼菌（ACC-1），摩氏摩根菌（DHA-1）和来自克吕沃尔菌属（*Kluyvera* spp.）的非常成功的可水解头孢噻肟的 CTX-M 型 ESBL[21,32-34]。此外，许多致病细菌中的氨基糖苷修饰酶（aminoglycoside-modifying enzyme，AMEs）被认为起源于环境中的不动杆菌属[35]。Tn *916* 是最初发现于粪肠球菌的一个 18kb 片段，但其宿主范围非常广泛，现已在多种革兰阳性细菌中发现[36]。Tn *916* 携带 *tet*（M）耐药基因，该基因编码产物具有对四环素和米诺环素的耐药性。现在在肠球菌和其他细菌中存在许多不同的 Tn *916*-like 转座子，其中一些，例如来自肺炎链球菌的 Tn *1545*，还具有其他耐药基因（对红霉素和卡那霉素的耐药性）[36]。与 Tn *916* 具有结构相似性的转座子，还被认为与屎肠球菌菌株之间的万古霉素耐药性转移有关[37]。

许多耐药基因是从产生抗菌药物的生物（主要是链霉菌）中迁移出来的天然产物，这些生物已经产生并保留了这些基因，以保护自身免受自己副产物的侵害。例如，被认为起源于产生天然抗菌药物的糖多孢红霉菌（*Saccharopolyspora erythraea*）的 *erm* 基因通过甲基化 23S rRNA，阻断大环内酯类、林可酰胺类和链阳霉素 B 与靶向核糖体的结合。现在，许多质粒、整合子和转座子都带有多个耐药基因，具有对许多不同类型抗菌药物的耐药性。选择这些耐药基因中的任何一个将同时选择该质粒上包含的所有耐药基因。某些细菌属，例如，α 溶血链球菌属、奈瑟菌属、嗜血杆菌属和一些不动杆菌属，都是可自然转化的，可以

吸收和整合附近裂解生物体释放的DNA片段，从而产生"嵌合体"基因（"mosaic"gene）[38-39]。嵌合体基因的形成是导致肺炎链球菌对青霉素耐药的主要原因[40]。

(三)耐药机制的类型

1. 抗菌药物修饰 许多抗菌药物修饰酶，包括β-内酰胺酶、氨基糖苷修饰酶（AMEs）、氯霉素乙酰转移酶（chloramphenicol acetyltransferases，CATs）等都已有报道。虽然这些酶在很多情况下是获得性的，但也有些酶是某些菌属固有的。例如，染色体β-内酰胺酶在很多肠杆菌科和非发酵细菌中是固有的。通常这些酶的表达水平非常低，只对早期的β-内酰胺类耐药。某些菌属，比如肠杆菌属和假单胞菌属的染色体β-内酰胺酶受调节控制，会导致高水平、广谱β-内酰胺类耐药[41]。在某些情况下，AMEs是某些细菌所固有的，如斯氏普罗威登斯菌（*Providencia stuartii*）、黏质沙雷菌（*Serratia marcescens*）的染色体乙酰转移酶[42-43]。

修饰酶可以使细菌对具有抗菌活性的抗菌药物产生高水平耐药。例如，大肠埃希菌表达TEM-1型β-内酰胺酶，可以使氨苄西林MIC值从4μg/ml增至＞128μg/ml[44]。同样，粪肠球菌和无乳链球菌表达AME基因*aac*(6′)-*Ie-aph*(2″)-*Ia*，可以使庆大霉素MIC值增至＞1024μg/ml[45]。尽管这些耐药机制十分有效，但一些抗菌药物似乎不受这些灭活酶的影响。自1958年起万古霉素就开始在临床上应用，至今在细菌中仍没有万古霉素修饰酶出现。

2. 细菌抗菌药物靶位修饰 由于抗菌药物与靶分子间的相互作用通常是特异的，因此，靶分子微小的改变就会对抗菌药物的结合产生重要影响。抗菌药物靶位修饰作为耐药机制的例子非常多，包括多种红霉素核糖体甲基化酶导致大环内酯类-林可酰胺类-链阳霉素B-酮内酯（macrolide-lincosamide-streptogramin B-ketolide，MLS_BK）类抗菌药物耐药[46]。青霉素结合蛋白（penicillin binding protein，PBPs）的修饰可以影响这些分子与β-内酰胺类抗菌药物的亲和力，如上面提到的肺炎链球菌，和通过PBP5突变产生对氨苄西林耐药的屎肠球菌[47-48]。

其他重要的靶位修饰的例子包括改变细胞壁前体而产生对糖肽类抗菌药物耐药、DNA旋转酶和拓扑异构酶Ⅳ突变导致氟喹诺酮类抗菌药物耐药、核糖体保护机制导致四环素类耐药，以及RNA聚合酶基因突变导致利福平耐药。靶位修饰产生的耐药程度是可变的，且可能取决于突变靶位执行正常靶位功能的能力。例如，肺炎链球菌PBPs突变导致相对低水平的耐药，而VanA型耐药基因导致肠球菌非常高水平的万古霉素耐药[48-49]。

3. 到达靶位通道受限 抗菌药物必须达到靶点才能发挥作用。因此，对于必须穿过屏障才能到达靶点的抗菌药物来说，加强屏障的作用可以作为一种高效的耐药机制。所有革兰阴性菌都有外膜结构，抗菌药物必须穿过细胞外膜才可以到达细胞质膜。如图71-1所示，这是通过OMP形成的水通道实现的。有文献报道，减少OMP的数量是铜绿假单胞菌对亚胺培南耐药、阴沟肠杆菌对头孢吡肟耐药和肺炎克雷伯菌对头孢西丁或头孢他啶耐药的重要机制[33,50-51]。在某些情况下，这种进入细胞的限制必须与至少为中度活性的β-内酰胺酶同时存在才产生高水平耐药[33]。细胞质膜也存在进入的屏障。氨基糖苷类跨过细胞质（内）膜的活动是一个氧依赖的过程，因此，这些抗生素在厌氧环境下是无活性的（故对严格厌氧菌无效）[52]。

当涉及多个机制时，很难将耐药归因于特定机制。例如，铜绿假单胞菌对亚胺培南的耐药归因于OprD的下调和产AmpC β-内酰胺酶，减少了抗菌药物的进入[50]。单独的任意一种机制都不足以产生临床上显著水平的耐药性，要获得高水平的耐药性，需要2种机制。

4. 外排泵（efflux pumps） 致病细菌包含外排泵，可将毒素、染料和抗菌药物从细胞内排出。多种类型的泵已经在革兰阳性菌和革兰阴性菌中被发现。这些外排泵可能具有高度选择性，也可能具有广谱底物特异性。大部分外排泵位于细胞质膜上，利用质子动力外排药物。主要的外排转运子家族包括：①主要易化子超家族（major facilitator superfamily，MFS），包括革兰阳性菌的QacA、NorA/Bmr和大肠埃希菌的EmrB；②小多重耐药家族（small multidrug resistance family），包括金黄色葡萄球菌的Smr和大肠埃希菌的EmrE；③耐药结节细胞分化（resistance-nodula-

tion-cell division,RND)家族,包括大肠埃希菌的AcrAB-TolC 和铜绿假单胞菌的 MexAB-OprM(图 71-1)[53]。ABC(ATP 结合盒转运蛋白)家族与其他家族的不同之处在于,它们从 ATP 的水解中获取能量以驱动主动外排,而其他家族从维持在细菌细胞质膜上的质子梯度中获取能量。在所有家族中,泵蛋白位于细菌的细胞质膜中,识别化合物并负责这种能量依赖的外排。除 RND 家族外,所有泵家族的成员在革兰阳性菌和革兰阴性菌中均被发现,并且仅跨越细胞质膜。根据组成的不同,所有家族均有助于革兰阴性菌产生耐药性,但非 RND 家族的泵只能将化合物排入胞质和外膜之间的周质空间,而不排入细胞外部。

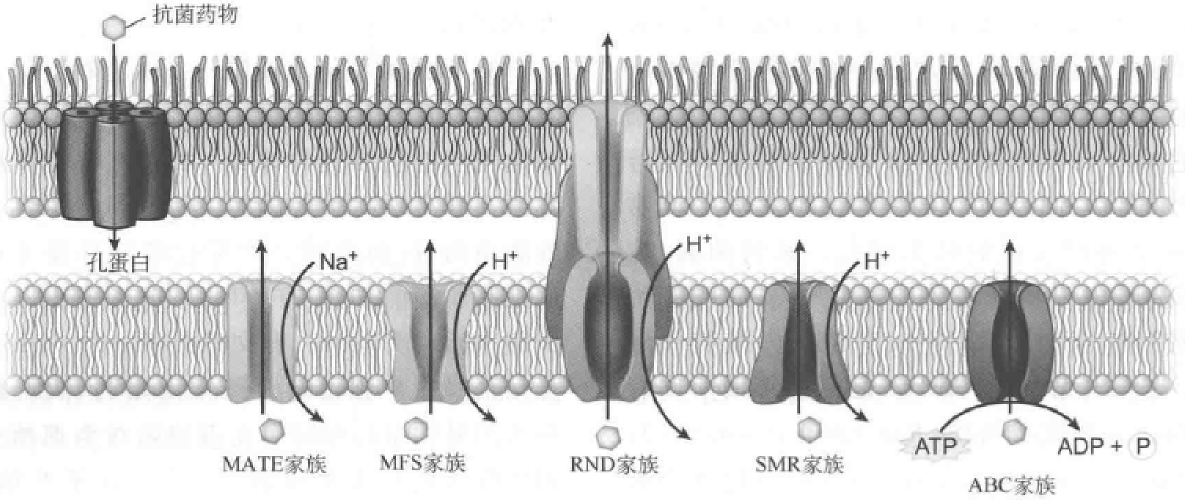


图 71-1 OMP 和外排泵。图中显示了外排泵家族的一般结构及在革兰阴性菌细胞壁中的位置。革兰阴性菌细胞壁有 2 个膜:内膜在这里显示为黄色的对称双层;外膜不对称,在内层上有磷脂(黄色),在外层上有脂多糖(粉红色)。只有 RND 家族外排泵具有跨 2 个膜的结构。抗菌药物(绿色)可以通过充满水的孔蛋白进入细胞,然后由外排泵排出,见彩插

仅在革兰阴性菌中发现的 RND 家族外排泵具有附加的元件,这些元件由 3 个结构组成,这些结构包括位于内膜的泵元件,外膜通道元件和跨越内膜和外膜的将这些元件连接起来的周质膜融合蛋白(图 71-1)。这个泵晶体结构的解析是一个重大成就,揭示了泵中存在一个可以允许分子通过的周质开口,这就解释了之前人们的困惑:即 RND 泵的底物包含 β-内酰胺类抗菌药物(不进入细胞周质)[54]。此外,RND 泵以其较大的结合区著称,具有识别和排出多种结构上不相关的分子的能力(包括许多不同类别的抗菌药物),并且是导致革兰阴性病原菌耐药的最重要的外排泵[55]。RND 外排泵的命名通常按以下顺序:膜融合蛋白-泵-外膜通道元件。研究最多的 RND 泵是大肠埃希菌的 AcrA-AcrB-TolC(缩写为 AcrAB-TolC)和铜绿假单胞菌的 MexAB-OprM。在某些情况下,不同类型泵的组合可能会比一种单独的泵产生更高水平的耐药[56]。

二、广谱抗菌药物耐药机制

(一)氨基糖苷类的耐药(aminoglycoside resistance)

几种不同的氨基糖苷类耐药机制可以共存在于同一细菌中。在临床分离物中,氨基糖苷类抗菌药物的最常见耐药机制是:①AMEs 使氨基糖苷分子发生酶失活;②由于细胞通透性下降而导致的抗菌药物吸收减少;③抗菌药物从细胞内被外排泵排出;④核糖体改变而抑制氨基糖苷类的结合,包括被 16S rRNA 甲基化酶甲基化[57-58]。

在上述机制中,AMEs 和 16S rRNA 甲基化酶令人担忧,因为它们通常作为可移动遗传元件(如整合子、质粒和转座子)的一部分,可以在其他细菌中传播[59]。此外,它们介导所有氨基糖苷类耐药性,包括吡唑米星(plazomicin)。此外,这些遗传元件通常包含其他抗菌药物的耐药基因,包

括β-内酰胺类、喹诺酮类、四环素类、大环内酯类和氯霉素。

1. AMEs 从引起耐药发生的频率来看，AMEs使氨基糖苷失活是最重要的氨基糖苷耐药机制[60]。AME基因在某些物种中是固有的，并且可以从其他几种微生物中获得，包括需氧革兰阳性球菌和革兰阴性杆菌、厌氧菌和分枝杆菌属[59]。AMEs通过催化氨基糖苷分子中不同氨基或羟基的共价修饰，产生不易与核糖体结合的产物来介导高水平耐药[57]。AMEs根据其催化修饰的类型进行分组，如氨基糖苷乙酰转移酶(aminoglycoside acetyltransferases，AACs)、核苷酸转移酶、腺苷转移酶(adenyltransferases，ANTs)或磷酸转移酶(phosphotransferases，APHs)[60]。

AMEs的命名很复杂，目前有2个系统在使用[59]。一个系统将上述功能分组按照3个字母组成的标识符，然后在括号中添加一个数字，该数字对应于氨基糖苷分子中的修饰位点。破折号后面用罗马数字表示宿主中编码的耐药谱，小写字母用作单独的标识符；例如，*aac*(6′)-Ⅰ*b* 用于编码乙酰化位置为6′的乙酰转移酶的基因，该基因介导与其他AAC(6′)-Ⅰ酶类相同的耐药模式[庆大霉素和(或)阿米卡星耐药]，并指定为变异体b。另一种命名方案还使用上述分组的3个字母代码(基因为 *aac*，*aad* 和 *aph*)，然后使用大写字母标识修饰位点，并使用数字作为唯一标识符(如 *aadA1*，编码修饰位置A的核苷酸转移酶)。两种命名方式都有其优点和缺点。但是，需要一个共识方案来避免混淆。该方案应考虑测序技术的出现和最近描述的基因经常缺乏表型特征。

表71-1总结了AMEs的主要类别和子类别，以及它们的临床相关性和可能的修饰底物。乙酰转移酶主要分为4类：AAC(1)、AAC(3)、AAC(2′)和AAC(6′)，其中后者是需氧革兰阳性菌和革兰阴性菌中最常见的AME[59]。在AAC(6′)酶中，AAC(6′)-Ⅰb(也称为 *aacA4*)非常流行，并且在NCBI数据库中至少包括45个变异体，其中32个AAC(6′)-Ⅰb序列不同[61]。值得注意的是，这些变异体之一，AAC(6′)-Ⅰb-cr可乙酰化氨基糖苷类和喹诺酮类，对2种类型的抗菌药物均产生耐药性[62]。据报道该酶在全世界的分离株中普遍存在[63]。

表 71-1 临床分离菌株中主要的 AME

AME分类和亚类	报道的菌种	底物
乙酰转移酶		
AAC(1)	罕见	阿普霉素、布罗霉素、利维霉素、巴龙霉素、核糖霉素、新霉素
AAC(3)		
AAC(3)-Ⅰ	革兰阴性菌	庆大霉素、西索米星、福提霉素
AAC(3)-Ⅱ	革兰阴性菌	庆大霉素、奈替米星、妥布霉素、西索米星、地贝卡星
AAC(2′)	革兰阴性菌和分枝杆菌	庆大霉素、妥布霉素、地贝卡星、卡那霉素、奈替米星
AAC(6)		
AAC(6′)-Ⅰ	革兰阴性菌和革兰阳性菌	阿米卡星、庆大霉素C1 [AAC(6′)-Ⅰb-cr乙酰化物环丙沙星]
AAC(6′)-Ⅱ	革兰阴性菌和革兰阳性菌	阿米卡星、庆大霉素C1a和C2
磷酸转移酶		
APH(4)	罕见	
APH(6)	链霉菌属固有蛋白，革兰阴性菌和革兰阳性菌	链霉素
APH(9)	罕见	大观霉素
APH(3′)		
APH(3′)-Ⅰ	革兰阴性菌	卡那霉素、新霉素、巴龙霉素、核糖霉素、利维霉素
APH(3′)-Ⅱ	革兰阴性菌	卡那霉素、新霉素、布替罗星、巴龙霉素、核糖霉素
APH(3′)-Ⅲ	革兰阳性菌	卡那霉素、新霉素、利维霉素、巴龙霉素、利福霉素、布替罗星、阿米卡星、异帕米星
APH(3′)-Ⅵ	革兰阴性菌	卡那霉素、新霉素、巴龙霉素、核糖霉素、布罗霉素、阿米卡星、异帕米星

（续 表）

AME 分类和亚类	报道的菌种	底物
APH(2")	革兰阳性菌	庆大霉素
APH(3")	罕见	链霉素
APH(7")	罕见	潮霉素 B
核苷酸转移酶		
ANT(6)	革兰阳性菌	链霉素
ANT(9)	革兰阳性菌	大观霉素
ANT(4′)	革兰阳性菌和革兰阴性菌（较少见）	妥布霉素、阿米卡星、异帕米星；一些变异体介导地贝卡星耐药
ANT(2")	革兰阴性菌	庆大霉素、妥布霉素、地贝卡星、西索米星、卡那霉素
ANT(3")	革兰阴性菌	大观霉素、链霉素

目前，共有 7 种主要的磷酸转移酶，包括 APH(4)、APH(6)、APH(9)、APH(3′)、APH(2")、APH(3")和 APH(7")。其中，APH(3′)是临床上最相关的一类，是导致革兰阴性菌和革兰阳性菌对几种氨基糖苷分子获得耐药性的原因。在已被报道的 5 种核苷酸转移酶中，即 ANT(6)、ANT(9)、ANT(4′)、ANT(2")和 ANT(3")，后 2 个最重要。因为其通常位于肠杆菌科细菌和非发酵革兰阴性菌携带的 1 类和 2 类整合子的基因盒中。ANT(2")-Ⅰa，也称为 *aadB*，是同类中的唯一变异体。尽管已描述了 ANT(3")的几种变异体，但 ANT(3")-Ⅰa（也称为 *aadA*1）最常被报道[59]。评估 AMEs 发生的初步研究包括对氨基糖苷类耐药模式的评估及这些基因的有限分子表征。最近，随着测序方法的广泛使用，以及对 AME 基因复杂性的更好理解，通过其表型特征推断细菌中是否存在 AMEs 是徒劳的。

2. 因摄取和外排减少而产生的耐药 膜通透性降低是一种固有耐药机制，已在多种细菌中观察到（厌氧菌和某些兼性厌氧菌，包括非发酵革兰阴性杆菌，肠球菌和某些葡萄球菌的小菌落变异体），可介导氨基糖苷低水平的交叉耐药[57]。临床分离株因通透性的丧失而产生耐药性的报道并不常见。

氨基糖苷分子的主动外排主要在非发酵革兰阴性杆菌中观察到。诱导型 RND 型外排泵 MexXY-OprM 和 AdeABC 分别与铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌的氨基糖苷耐药相关[64-65]。2 种系统可外排氨基糖苷类和其他类别的抗菌药物。据报道，来自大肠埃希菌的多药外排转运蛋白与 MexY(AcrD)具有同源性，可介导氨基糖苷耐药。然而，这种机制在临床分离株中的重要性尚不清楚[66]。

3. 核糖体改变和 16SrRNA 甲基化酶 核糖体突变可能影响氨基糖苷结合位点；然而，肠杆菌科细菌和非发酵革兰阴性菌中 16S rRNA 甲基化酶对核糖体的甲基化是一个新出现的问题[67]。16S rRNA 甲基化酶介导氨基糖苷类药物的高水平耐药，如临床使用的阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素和一种对大多数 AMEs 稳定的新型氨基糖苷类药物吡唑米星。如前所述，16S rRNA 甲基化酶令人担忧是因为编码这些酶的基因位于质粒或可转移元件中，而质粒或可转移元件通常携带广谱 β-内酰胺酶的基因，如 NDM、CTX-M 和 KPC[68]。

由于可产生染色体 16S rRNA 甲基化酶，天然产生氨基糖苷类的放线菌对氨基糖苷类固有耐药。获得的 16S rRNA 甲基化酶基因与固有的基因具有同源性，根据序列同源性和核糖体残基甲基化程度，这些酶可分为 2 组。一组甲基化 G1405 残基，介导对阿米卡星、妥布霉素和庆大霉素的耐药，但对阿普霉素和链霉素不具有耐药性，包括获得的 ArmA 酶和 RmtA 至 RmtH 酶[58]。另一组甲基化 A1408 残基，介导对所有氨基糖苷类的耐药，只有一个很少报道的获得性甲基化酶代表 NpmA[69]。

（二）β-内酰胺类耐药（β-lactam resistance）

1. PBP 介导的耐药 β-内酰胺类抗生素（青霉素、头孢菌素、单环酰胺类、碳青霉烯类）通过抑

制 PBPs 发挥作用，PBPs 是参与细菌细胞壁肽聚糖合成的转肽酶和糖基转移酶。PBPs 所有成员都属于丝氨酸肽酶这个更大的家族，后者包括了大部分 β-内酰胺酶。β-内酰胺分子是肽聚糖前体的肽基-D-丙氨酰基-D-丙氨酸（peptiDyl-D-alanyl-D-alanine）末端的结构类似物，可模拟 PBP 的天然底物[70]。PBP 和 β-内酰胺酶均通过催化水解 β-内酰胺键与 β-内酰胺类抗生素相互作用，形成丝氨酸酯连接的酰基酶复合物（图 71-2*）。β-内酰胺酶一个水分子水解该酰基酶中间产物的酯键，打开环并使药物分子失活，然后释放具有不可逆损坏性的青霉噻唑基（或头孢噻唑酰基）成分，并重新产生活化 β-内酰胺酶。PBP 和 β-内酰胺类之间形成的复合物更稳定，具有非常长的周转率（turnover rate），这导致 PBP 的功能失活。这种相互作用的稳定性可以通过检测放射性元素标记青霉素的结合来鉴定这些蛋白质，这也是被命名为 PBP 的由来[70]。一些 PBP 对细胞生存能力至关重要（通常是高分子量转肽酶及其伴侣糖基转移酶），低分子量羧肽酶 PBPs 则不是。长期以来，人们一直怀疑某些 PBPs 是冗余的，并且可以执行其他 PBPs 的功能。抑制 PBPs 会扰乱细胞壁合成，这本身只会抑制细菌的生长而不会杀死细菌。然而，PBPs 和 β-内酰胺分子的相互作用会触发细胞壁降解分子，即自溶素的活化，导致细胞破裂，进而死亡[71]。

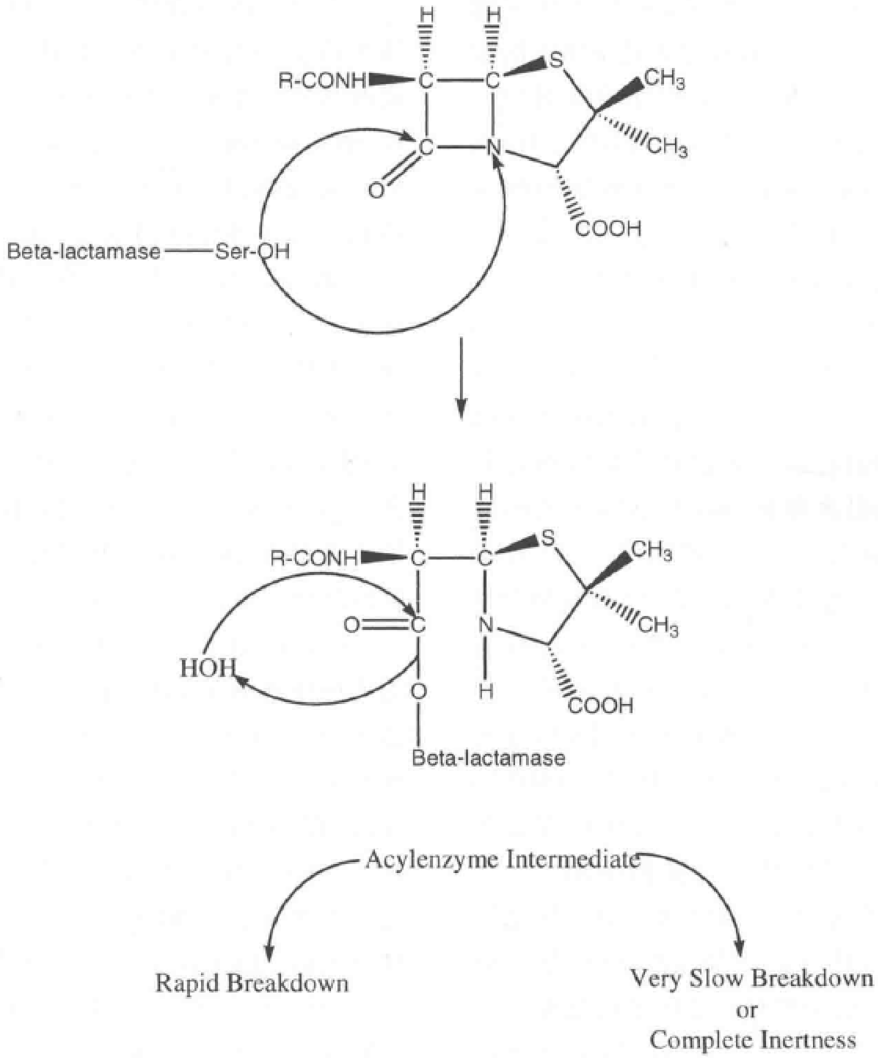


图 71-2 Serine β-lactamases and their reactions with β-lactam carbonyl donors.（Modified from reference 421.）

*译者注：原著引用其他著作图，未经原作者授权翻译，故此保留原图

某些菌种由于PBP亲和力低而对某些β-内酰胺类抗菌药物具有固有耐药。例如，肠球菌具有低亲和力PBP5，因而对临床上可达到浓度的头孢菌素耐药。正常的敏感细菌中PBP介导的耐药可有多种形式，包括①PBP过量产生；②获得外源性低亲和力PBP；③敏感PBP与更耐药PBP变异体重组；④PBP点突变导致与β-内酰胺类抗菌药物亲和力降低。PBP介导的耐药主要见于革兰阳性菌。

(1)PBP过度表达：对β-内酰胺类抗菌药物敏感或耐药还取决于相对于靶标数量的β-内酰胺抗生素分子的数量。在适当的情况下，增加靶分子的数量会导致耐药发生。作为介导耐药的机制，PBP表达的增加相对少见。但是，在某些特定情况下已注意到这一点。例如，在过表达PBP4的金黄色葡萄球菌菌株中发现*mecA*阴性菌株对甲氧西林的耐药性升高。此外，在过表达PBP5的菌株中，海氏肠球菌(*Enterococcus hirae*)和屎肠球菌对青霉素的耐药性也有所提高[72]。β-内酰胺类泛耐药的铜绿假单胞菌临床分离株中也报告了PB-Ps表达模式的改变[73]。

(2)获得外源性PBPs：获得外源性PBP作为一种耐药机制，最典型的例子是金黄色葡萄球菌甲氧西林耐药性的表达。金黄色葡萄球菌通过获取和表达一种非自身来源由*mecA*基因编码的低亲和力PBP 2a而对甲氧西林耐药[74]。携带*mecA*的细菌对可以与PBP 2a结合的抗MRSA的头孢菌素(如头孢洛林和头孢吡普)以外的所有β-内酰胺类抗菌药物耐药[75]。*mecA*基因位于金黄色葡萄球菌染色体的一个可移动元件内，称为葡萄球菌染色体基因盒(SCC*mec*)区域。PBP 2a被归类为B类PBP，即它有一个功能性C端转肽酶区域，而它的N端结构域的功能仍不确定。这与A类PBP截然相反：A类PBP含有具有糖基转移酶活性的N端和具有转肽酶活性的C端。因此，天然存在的金黄色葡萄球菌PBP2的糖基转移酶结构域对于PBP 2a介导的β-内酰胺类抗菌药物耐药是必需的[76]。

*mecA*基因的起源至今未知。在啮齿动物有关的葡萄球菌菌种松鼠葡萄球菌(*Staphylococcus sciuri*)中曾经鉴定到一种*mecA*同源物[77]。氨基酸序列比对发现这2种酶的蛋白质序列有88%的相似性，转肽酶结构域的一致性为91%。在金黄色葡萄球菌中甲氧西林耐药的表达通常受上游*mec* Ⅰ基因或由同源*bla* Ⅰ基因反式表达产物的调控，调控葡萄球菌β-内酰胺酶的表达[78]。*mecI*/*bla* Ⅰ阻遏子反过来会受*mecR*1和*blaR*1感应器/传感器的调控。这种诱导效率因机制而异(*blaR*1-*bla* Ⅰ介导的诱导更快)，因此检测甲氧西林耐药表型显得更加复杂。事实上，在耐药菌群中，只有一小部分可以表达高水平的耐药。在实验室中，多种技术可以增强这种耐药性的检测，例如延长培养时间、增加培养基的盐浓度、头孢西丁药敏试验。此外，最近已经有技术被开发出来，无须检测表型，而是直接检测*mecA*基因或PBP 2a[79]。

在金黄色葡萄球菌中，PBP 2a介导的β-内酰胺类抗菌药物耐药也受其他基因位点如*fem*(甲氧西林耐药的必要因素)或*aux*基因(起辅助作用)表达的影响[74]。*fem*和*aux*基因最初是在将MRSA菌株进行转座子突变以寻找会降低耐药表达的插入序列时被发现的。现在已经鉴定出很多*fem*和*aux*因子，都参与葡萄球菌细胞壁的形成。这些研究表明，在细胞壁正常合成的过程中轻微的干扰就会阻碍PBP 2a的功能，说明它是非常特殊的酶。2011年，欧洲的人和动物中分离出的MRSA被首次发现携带异型*mecA*同源基因，命名为*mecC*基因[80]。可以利用药敏试验检测菌株是否携带*mecC*基因，但现有以*mecA*或PBP 2a为检测靶点的商品化试剂盒不适用。

*mecA*基因位于一个分子量更大(21～67 kb)的染色体区域上，这个区域被称为葡萄球菌染色体基因盒(staphylococcal chromosomal cassette，SCC*mec*)区域[81]。*ccrA*/*ccrB*或*ccrC*基因的存在，使得SCC*mec*成为可移动元件。已经发现了许多不同的*mec*区(SCC*mec* Ⅰ～Ⅺ)[82-84]。与医院感染相关的MRSA分离株(例如，USA100)具有较大的SCC*mec*区(Ⅰ～Ⅲ型)，因为随时间的增加，整合的质粒或转座子有助于菌株多重耐药的形成[81]。相比之下，大多数社区获得性MRSA USA300分离株在其小的(20～30 kb)Ⅳ型SCC*mec*复合物中几乎没有其他成分，并且很少具有多重耐药性[82,85]。尽管SCC*mec*元件在体外从未显示出可转移性，然而最近却有令人信服的研究在临床分离株中发现获得性Ⅳ型SCC*mec*元件[86]。

人类是包括 MRSA 在内的金黄色葡萄球菌的天然贮藏库，鼻咽、会阴或皮肤的无症状定植很普遍。这通常发生在出生后不久，并且可能在一生中都是短暂的[87]。传播通常通过与定植的携带者直接接触而发生。在成年人中，对于普通公众而言 MRSA 携带率高达 25%[87-88]。在患有胰岛素依赖型糖尿病、皮肤病、长期留置血管内导管及有注射毒品史的患者中观察到更高的发生率。人们认为，医护人员可能是 MRSA 的重要储存库[3]。幼儿往往具有较高的定植率，这很可能是由于经常接触其他儿童的身体分泌物造成的[5]。流行菌株已经蔓延到整个医院，甚至整个城市。*mecA* 遗传环境的稳定性在不同的金黄色葡萄球菌克隆之间有所不同，这可能是对在其中发现了有限的耐药流行克隆的一种可能的解释[89]。

(3)与外源 DNA 重组导致耐药突变：固有敏感的 PBPs 和不太敏感的 PBPs 之间重组导致的耐药多数情况下仅发生在能够自然转化或可以从环境中摄取裸露 DNA 的菌种上。最为显著的是肺炎链球菌、草绿色链球菌群、淋病奈瑟菌和脑膜炎奈瑟菌[48]。肺炎链球菌含有 6 种 PBPs(1a、1b、2a、2b、2x 和 3)，均可以与转化摄取的外来 PBPs 重组。在大多数情况下，青霉素耐药肺炎链球菌中的 PBP 耐药基因表现出嵌合模式，来自青霉素较不敏感的草绿色链球菌群的外源 PBP 基因整合到天然 PBP 基因中[48]。PBPs 2x、PBPs 2b 和 PBPs 1a 的变化可以导致肺炎链球菌对青霉素耐药，而头孢菌素耐药仅需要 PBPs 2x 和 PBPs 1a 发生改变[90]。对头孢菌素耐药而对青霉素敏感的菌株也有几例报道[91]。对 β-内酰胺类高度耐药(≥2 μg/ml)说明通常不止一种 PBP 发生了改变，有时一种 PBP 会发生几处基因嵌入[90]。

在革兰阴性病原菌中，脑膜炎奈瑟菌和淋病奈瑟菌中都发现嵌入式 PBP 基因与青霉素的敏感性降低具有相关性[48]。与肺炎链球菌的机制类似，这些细菌 PBP 基因中的耐药部分是从亲缘关系紧密且对青霉素更为耐药的共生奈瑟菌属细菌中获得[92]。虽然脑膜炎奈瑟菌对青霉素耐药极其罕见，但在淋病奈瑟菌中由 β-内酰胺酶和 PBP 介导的 β-内酰胺类抗菌药物耐药很常见。

(4)点突变：PBP 介导的 β-内酰胺类抗菌药物耐药的最后一种机制是 *pbp* 基因内部的点突变，导致与 β-内酰胺类抗菌药物的亲和力降低。这种形式的突变耐药最常见于屎肠球菌的 PBP 5，其突变可以导致青霉素的 MIC 从 4 μg/ml 上升到 16 μg/ml，甚至>1000 μg/ml。美国屎肠球菌临床分离株大多数都是高水平青霉素耐药株[93]。大多数突变发生在与 β-内酰胺类抗生素结合密切相关的一个或更多的保守盒的附近[94]。对几个常见的 PBP 5 突变的研究表明，随着突变数量的增加耐药性会增加，但其中一些位点突变会造成比其他位点突变更高水平的耐药[95]。对青霉素的敏感性降低与 PBP2x 的点突变相关，但此机制并不常见[96-97]。在一株青霉素非敏感的无乳链球菌分离株中检测到 PBP1a 和 PBP 2a 的突变[98]。在极少数情况下，金黄色葡萄球菌 *pbp2* 基因的点突变与甲氧西林低水平耐药相关[98]。MRSA 菌株中 PBP 2a 的改变可导致头孢洛林 MIC 值增加[100-101]。

在革兰阴性菌中，流感嗜血杆菌 *fts* Ⅰ 基因[编码 PBP 3a 和(或)PBP 3b 转肽酶区域]的点突变已经被证实与非 β-内酰胺酶介导的氨苄西林和头孢菌素耐药相关[102]。虽然人们已经关注到这些菌种中还存在 PBP 4 突变，但其是否对 β-内酰胺类抗菌药物的敏感性有显著影响尚不明确。以前没有认识到肠杆菌科细菌和非苛养非发酵菌的 PBP 改变是革兰阴性病原菌耐药的主要原因。然而，碳青霉烯类和新的 β-内酰胺类抗菌药物-β-内酰胺酶抑制剂合剂的广泛使用对这些生物体中 PBP 表达模式改变和(或)PBP 突变的出现也施加了选择压力。在大肠埃希菌的突变体中发现了 PBP2 中的氨基酸替代会影响碳青霉烯类抗生素的敏感性[103]。此外，在大肠埃希菌的突变体中还发现了 PBP 3 中的氨基酸插入会影响一系列 β-内酰胺类抗菌药物的敏感性，包括头孢他啶和氨曲南，以及这些 β-内酰胺类抗生素与阿维巴坦的组合[104]。这些突变也已在产生金属 β-内酰胺酶的大肠埃希菌临床分离株中发现，从而导致对氨曲南-阿维巴坦的耐药[105]。

2. β-内酰胺酶介导的耐药　在 β-内酰胺类抗菌药物耐药机制中，就流行率和临床相关性而言，β-内酰胺酶是最重要的。这些酶是肠杆菌科细菌和许多非发酵菌中 β-内酰胺类抗菌药物耐药的主要机制。几种细菌具有固有的，染色体编码的 β-内酰胺酶，可以组成性或诱导性表达。许多其他 β-内酰胺酶属于获得性耐药，并位于可移动遗传结构，例如，质粒、转座子和整合子，可以在相同或不

同物种的菌株之间转移。这些可移动的遗传元件通常携带编码对其他无关抗菌药物类别的耐药基因,从而使其受体获得多重抗药性表型。

(1)β-内酰胺酶的作用机制:β-内酰胺酶是可以在β-内酰胺环的不同残基中起作用的D-Ala羧肽酶[106]。这些蛋白质被合成为前体蛋白质,并通过氨基末端信号肽输出到周质空间。运输后,β-内酰胺酶的信号肽被切割并释放出酶。在革兰阴性细菌中,β-内酰胺酶被分泌到周质中,导致这些酶在有限的空间内浓缩,并与穿透外膜的β-内酰胺分子有效相互作用。在革兰阳性细菌中,β-内酰胺酶分子被分泌到细菌周围的环境中被稀释,因此对耐药表型的影响较小。

根据β-内酰胺酶的作用机制和分子结构,主要有2种类型:丝氨酸酶和金属β-内酰胺酶。丝氨酸酶的结构和水解特性各不相同。然而,所有这些酶通过催化位点的丝氨酸残基以两步反应水解β-内酰胺类抗生素。最初,β-内酰胺分子的带负电荷的羧酸盐基团被酶的带正电荷的残基吸引到活性位点。在特定位置,β-内酰胺与酶形成了关键的氢键相互作用[107]。接下来,β-内酰胺被酰化(图71-1),保守的丝氨酸残基(Ser70)在该酰化反应中用作反应性亲核试剂。然后,活化特定位置的水分子,使β-内酰胺脱酰基,并再生有活性的β-内酰胺酶。

金属β-内酰胺酶需要2个锌原子,它们通过氢氧根离子桥接,这有助于亲核试剂攻击β-内酰胺环的羰基氧原子,导致分子水解。锌原子由3个组氨酸残基和1个水分子固定在位。一些金属β-内酰胺酶含有第二个锌结合位点。2个锌结合位点分别起作用,主要锌结合位点由次要位点辅助[108]。

(2)β-内酰胺酶的分类:目前β-内酰胺酶的分类主要有2个方案:Ambler分类系统和Bush-Jacoby-Medeiros功能分类系统。Ambler分类系统依据氨基酸序列将β-内酰胺酶划分为4个不同的类别(A~D)。A、C和D类酶是丝氨酸β-内酰胺酶,而B类酶是金属β-内酰胺酶。功能分类方案是根据底物水解谱的相似性和对各种抑制剂的反应将β-内酰胺酶分类[109-110]。在更新的Bush-Jacoby-Medeiros系统中有3个组和多个亚组[组1、2(具有亚组2a,2b,2br,2d,2be,2c和2f)和3]。表71-2总结了这2种分类系统的比较。

表71-2 β-内酰胺酶的分类方案和特征

Ambler分类(谱)	Bush-Jacoby-Medeiros分组(谱)	底物	抑制剂	举例
A(丝氨酸β-内酰胺酶)	2a(青霉素酶)	青霉素类	克拉维酸、阿维巴坦和其他新型抑制剂	革兰阳性菌的青霉素酶
	2b(青霉素酶)	青霉素类、窄谱头孢菌素类	克拉维酸、阿维巴坦和其他新型抑制剂	TEM-1、TEM-2、SHV-1
	2be(ESBL)	青霉素类、头孢菌素类,包括超广谱	克拉维酸、阿维巴坦和其他新型抑制剂	SHV-2、TEM-10、CTX-M、GES-1
	2br(抑制剂耐药)	青霉素类	阿维巴坦和其他新型抑制剂	TEM-30、SHV-72
	2c(青霉素酶)	青霉素类、羧苄青霉素类	克拉维酸、阿维巴坦和其他新型抑制剂	PSE (CARB)
	2f(碳青霉烯酶)	青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类	阿维巴坦和其他新型抑制剂	KPC、SME、NMC-A、GES-2
B(金属β-内酰胺酶)	3(金属β-内酰胺酶)	大部分β-内酰胺类,包括碳青霉烯类、但不含单环酰胺类	螯合剂(EDTA)	IMP、VIM、NDM
C(头孢菌素酶)	1(头孢菌素酶)	青霉素、头孢菌素类	氯唑西林、阿维巴坦和其他新型抑制剂	染色体AmpC、CMY、DHA
D(苯唑西林酶)	2d(苯唑西林酶)	青霉素、氯唑西林;一些包括头孢菌素类和(或)碳青霉烯类	氯化钠;一些是克拉维酸、阿维巴坦和其他新型抑制剂	OXA-1 (与OXA-30相同)、OXA-10、OXA-48、OXA-23

关于β-内酰胺酶的文献非常广泛，为简单起见，下面的文字重点介绍了β-内酰胺酶的主要临床相关类别，并按活性谱进行了分组。

(3)β-内酰胺酶的活性谱

1)广谱β-内酰胺酶：属于功能分类2b组的青霉素酶是ESBLs和抑制剂耐药的TEM β-内酰胺酶的祖先[109-110]。在肠杆菌科中发现的2种常见的A类β-内酰胺酶称为TEM-1和SHV-1。TEM-1和SHV-1 β-内酰胺酶主要是青霉素酶，对头孢菌素底物的活性降低。在ESBLs出现之前，TEM-1是大肠埃希菌氨苄西林耐药的主要原因，并且现在仍然是淋病奈瑟菌青霉素耐药的最大贡献者。TEM-1的高表达与头孢菌素耐药和β-内酰胺类联合β-内酰胺酶抑制剂的耐药有关[111]。在肺炎克雷伯菌中，SHV-1-like酶普遍存在，许多酶是由已整合到染色体中的基因编码。

2)ESBLs：ESBL是属于Ambler分类的A类和Bush-Jacoby-Medeiros分类2be组的丝氨酸β-内酰胺酶。除了青霉素外，这些酶还水解窄谱和广谱头孢菌素。ESBLs容易受到克拉维酸、舒巴坦、他唑巴坦和新型抑制剂(如阿维巴坦)的抑制。在早期ESBL的定义中，β-内酰胺酶抑制剂的抑制是该组的主要特征，但近年来，满足ESBL组一个或多个特征的酶的多样性挑战了这一特征[112]。

ESBL酶的首次出现是TEM和SHV变体，显示出"扩大"或改变其底物谱的氨基酸替代。在TEM家族酶中，5个氨基酸残基对ESBL表型来说似乎是最重要的：包括位于b3β-折叠上的Gly238和Ala237，位于Ω环颈部的Arg164和Asp179和位于活化位点腔开口处G238和A237的正对面的Asp104[107,113]。在ABL第238位氨基酸用Ser，Ala或Asp取代Gly是TEM型和SHV型ESBL中的常见突变。TEM和SHV型ESBLs已在几个国家被鉴定出来，但由于CTX-M的分离株在全球范围内广泛传播，这些酶的重要性逐渐减弱。

CTX-M型β-内酰胺酶首次报道于20世纪80年代，已在全球范围内传播，如今已成为最常见的ESBLs[114]。这些酶可以分为与系统发育相关的不同组[115]。获得性的CTX-M酶主要分为五类：每个小组的成员具有超过94%的一致性(相比之下，不同组的成员的一致性≤90%)。这些组包括：①CTX-M-1组，包括CTX-M-1、-3、-10、-12、-15、-22、-23、-28和FEC-1；②CTX-M-2组，包括CTX-M-2、-4、-4L、-5、-6、-7、-20和Toho-1；③CTX-M-8(单例)；④CTX-M-9组，包括CTX-M-9、-13、-14、-16、-17、-19、-21、-24、-27和Toho-2；⑤CTX-M-25组，包括CTX-M-25和-26[115]。通常，CTX-M型β-内酰胺酶水解头孢噻肟和头孢曲松的能力优于头孢他啶。CTX-M-15比CTX-M-3水解头孢他啶的速率更快[116]。CTX-M型酶很容易被他唑巴坦和新的β-内酰胺酶抑制剂(如阿维巴坦和法硼巴坦)抑制[117]。

在环境生物的染色体中已鉴定出被认为是CTX-M型酶前体的基因，包括栖冷克吕沃菌(*Kluyvera cryocrescens*)(CTX-M-1 group)，抗坏血酸克吕沃尔菌(*Kluyvera ascorbate*)(CTX-M-2组)和佐治亚克吕沃尔菌(*Kluyvera georgiana*)(CTX-M-8，CTX-M-25和CTX-M-9)[118]。$bla_{CTX\text{-}M}$基因的转移涉及不同的遗传元件，包括质粒和可接合的遗传元件，例如，IS*Ecp*1-like、IS*CR*1和1类整合子[119]。

CTX-M型β-内酰胺酶在大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌中常见，但也可以在肠杆菌科的其他几种菌种中发现，包括伤寒和非伤寒沙门菌，志贺菌，弗氏枸橼酸杆菌，肠杆菌属，黏质沙雷菌和非发酵细菌[118,120]。ST131大肠埃希菌[121]的成功传播在一定程度上推动了CTX-M-15的传播。属于该ST分型和系统发生群B2的分离株具有几种毒力标记，可导致严重感染[122]。

除TEM、SHV和CTX-M以外，还存在许多临床上重要的ESBLs，包括GES、PER、VEB、BES、BEL、SFO和TLA[21]。在医院和社区中已观察到产ESBL的分离株[123]。产ESBLs的肠杆菌科细菌经验性和目标性的抗菌治疗的选择产生了巨大影响，确实推动了碳青霉烯类抗菌药物在许多医疗机构中的使用和碳青霉烯类抗菌药物耐药率的增加[120,124]。

3)抑制剂耐药的A类β-内酰胺酶：Bush-Jacoby-Medeiros分类2b组：属于功能分类2br组的抑制剂耐药β-内酰胺酶是氨基酸突变的TEM和SHV酶，其显示出对β-内酰胺酶抑制剂克拉维酸和舒巴坦的耐药；但是，大多数仍然对他唑巴坦敏感[109-110,125]。这些突变包括Met69、Ser130、Arg244、Arg275和Asn276[126]。大多数抑制剂耐药的β-内酰胺酶是TEM-1酶的变异体。迄今为

止，SHV-49 是临床分离到的 SHV 型 β-内酰胺酶中唯一对酶抑制剂耐药的酶[127]。TEM 和 SHV 家族酶中对抑制剂产生耐药的 β-内酰胺酶的频率可能被低估了，因为许多实验室没有常规鉴定这些菌株[128]。头孢菌素或大剂量哌拉西林-他唑巴坦可能能有效治疗某些产酶抑制剂耐药 β-内酰胺酶的大肠埃希菌。

维持 ESBL 表型但也显示出抑制剂耐药的 TEM 型 β-内酰胺酶突变体被称为复杂的 TEM 突变体 β-内酰胺酶[126]。通常使用用于检测 ESBLs 的任何筛选方法来检测这些变异体，并据此选择治疗方法。

4）AmpC β-内酰胺酶：AmpC β-内酰胺酶属于 Ambler 分类的 C 类（Bush-Jacoby-Medeiros 功能分类的 1 组）。它们介导对头孢菌素的耐药，包括头孢他啶、头孢噻肟和头孢曲松等氧亚氨基头孢菌素，以及头孢西丁等头霉素。它们还能够在较小程度上水解青霉素和某些单环酰胺类[110, 129]。大多数 C 类酶对克拉维酸、舒巴坦和他唑巴坦具有耐药作用；然而，新型抑制剂阿维巴坦、瑞来巴坦和法硼巴坦可有效抑制 C 类酶[117]。这些染色体介导的 β-内酰胺酶是由许多种革兰阴性菌产生的（沙门菌、克雷伯菌和奇异变形杆菌除外）[129]。

C 类 β-内酰胺酶比 A 类酶具有更大的活性位点，这可能使它们能够结合庞大的超广谱氧亚氨基-β-头孢菌素[130]。C 类头孢菌素酶酰化 β-内酰胺类抗生素的作用机制与 A 类酶相同。但是，催化事件有所不同[131-132]。C 类 β-内酰胺酶的结构首先报道于弗劳地枸橼酸杆菌的 AmpC 头孢菌素酶，然后是阴沟肠杆菌的 AmpC 酶（以 P99 和 GC1 为例）和大肠埃希菌[130, 133]。AmpC 酶氨基酸序列的差异也可以改变其水解特性和抑制剂耐药模式。事实证明，大肠埃希菌中 AmpC 酶的变异体（命名为 EC）具有更广的活性谱，能够更有效地水解氧亚氨基头孢菌素甚至头孢吡肟[134]。在铜绿假单胞菌中，称为 PDC 的染色体编码 AmpC 酶变异体具有将这些酶的活性谱扩展到亚胺培南、头孢他啶和头孢吡肟[135]。这些发现暗示不仅这些酶的产生量，而且其序列也影响对 β-内酰胺类的耐药水平。

AmpC 酶在弗劳地枸橼酸杆菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、黏质沙雷菌和铜绿假单胞菌的临床分离株中尤为重要，因为它们在这些菌种中是可诱导的。AmpC 的基础表达通常较低，但在暴露于某些 β-内酰胺类时可被诱导为高水平表达。在含可诱导 AmpC 的细菌中，*ampC* 基因伴随着抑制子 *ampR*，后者编码 LysR 转录调节因子家族的成员。该酶的抑制和激活与细胞壁肽聚糖合成和分解的过程密切相关。暴露于 β-内酰胺类后，肽聚糖合成的破坏会导致肽聚糖片段的积累，这些片段会取代通常以其抑制状态结合于 AmpR 的 UDP-*N*-乙酰胞壁酸的寡肽，引起构象变化，使 AmpR 正向激活 *ampC* 的转录。AmpR 的活性间接受 AmpD（一种 N-乙酰胞壁酰-L-丙氨酸酰胺酶 N-acetyl-muramyl-L-alanine amidase）和 AmpG（一种内膜通透酶）的活性控制，它们均参与肽聚糖中间体的回收[136-137]。因此，尽管在这些情况下可诱导 *ampC* 表达，但通过调控因子的基因突变也可诱导酶的组成性表达上调。在临床分离株中，AmpC 高表达的最常见原因是 *ampD* 中的一个或多个突变，从而导致 AmpD 数量减少或从细胞质中消失[138]。在这种情况下，细胞质中存在持续高水平的脱水-MurNAc 三肽，而 AmpR 不断激活 *ampC* 转录。*ampR* 的突变引起 AmpC 高表达已有报道，但并不常见。AmpR 蛋白既是 *ampC* 转录的抑制子又是激活子，并且是 LysR 家族的转录调节因子。AmpR 通过与一种肽聚糖前体分子 UDP-MurNAc 五肽的相互作用而充当抑制子。这样可以防止 AmpR 与 *ampR* 基因结合并随后激活 *ampC*。当细胞壁分解产物脱水-MurNAc 三肽（或脱水-MurNAc 五肽）的浓度升高时，如暴露于某些抗菌药物，UDP-MurNAc 五肽从其在 AmpR 中的位点被置换，导致 AmpR 转化为 *ampC* 转录激活子。

AmpC 型 β-内酰胺酶也可以在质粒表达，现已广泛传播。1989 年，从韩国伤口感染样本中分离出的肺炎克雷伯菌含有第一个质粒编码的 AmpC 酶变异体 CMY-1。该分离株因对头孢西丁的高度耐药性而引发关注，该酶被命名为 CMY，即头孢菌素酶[139]。随后，在临床分离株中，特别是在肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌中，报道了几个质粒编码的 AmpC 变异体。基于 *ampC* 基因的来源，已报道几个质粒编码的 AmpC 家族：包括分别来自弗劳地枸橼酸杆菌和嗜水气单胞菌的两个 CMY 家族（CMY-1 和 CMY-2）；源自气单胞菌属（*Aeromonas* spp.）的 FOX 和 MOX 家族；来

自蜂房哈夫尼菌(*H. alvei*)的ACC家族;来自弗劳地枸橼酸杆菌的LAT家族;来自肠杆菌属的MIR和ACT家族;以及来自摩氏摩根菌的DHA家族[32, 129, 140]。非诱导的质粒编码的AmpC变异体的高表达主要是由于强启动子和基因高拷贝数。与其他几个质粒携带的抗菌药物耐药基因一样,带有AmpC型β-内酰胺酶基因的质粒通常带有氟喹诺酮类、磺胺类、四环素类、氨基糖苷类、氯霉素、甲氧苄啶和其他β-内酰胺酶(ESBLs和金属β-内酰胺酶)的耐药基因[129, 139, 141-142]。在世界各地的许多革兰阴性菌中都发现了质粒介导的C类β-内酰胺酶。带有这些酶的宿主菌株包括肺炎克雷伯菌、产气肠杆菌、肠炎沙门菌Senftenberg血清型、大肠埃希菌、奇异变形杆菌、摩氏摩根菌和产酸克雷伯菌。携带质粒编码AmpC酶的肺炎克雷伯菌和肠炎沙门菌临床菌株中发生的孔蛋白缺失可导致对碳青霉烯类抗生素的耐药性[33, 143]。

5)苯唑西林水解D类β-内酰胺酶:OXA型酶是苯唑西林水解酶,属于Ambler分类的D类和Bush-Jacoby-Medeiro功能分类的2d组β-内酰胺酶。OXA是一大类在底物谱和序列中显示出可变性的酶。OXA也不同于其他组,D类与A类或C类β-内酰胺酶之间的氨基酸一致性小于20%[144]。

与青霉素相比,OXA酶对苯唑西林酶的水解活性更高,该组成员可以水解头孢菌素,包括氧亚氨基头孢菌素类、头霉素类或碳青霉烯类[145]。OXA酶仅被克拉维酸盐微弱抑制。然而,OXA-2和OXA-32可被他唑巴坦抑制。阿维巴坦可抑制OXA-48,但对其他OXA酶无作用[146]。多种OXA型β-内酰胺酶,如OXA-11、OXA-14~OXA-20,与ESBL表型相关[145]。这些OXA表型仅见于铜绿假单胞菌,并且许多衍生自OXA-10和OXA-2。尽管OXA-1(与OXA-30相同)能很好地水解头孢吡肟,但许多作者并不认为该酶是ESBL[147]。此外,$bla_{\text{OXA-1}}$在肠杆菌科中非常普遍,似乎常与$bla_{\text{CTX-M-15}}$同时被检测到[148]。

由于这类成员具有水解碳青霉烯类的能力,OXA型酶变得越来越重要。尽管OXA型碳青霉烯酶不能有效地水解亚胺培南,但它们在具有外排泵或孔蛋白突变的菌株中可以介导临床高水平耐药[149]。鲍曼不动杆菌中第一个报道的OXA型碳青霉烯酶是OXA-23,最初在1985年被命名为ARI-1[150]。随后,在鲍曼不动杆菌中还报道了其他获得性的碳青霉烯酶,包括OXA-58、OXA-24/-40和OXA-143[149, 151]。其中,OXA-23是不动杆菌中最常见的酶。几乎所有鲍曼不动杆菌菌株都具有染色体编码的苯唑西林酶OXA-51及介导非常低水平的碳青霉烯耐药的相关变异体[149]。当诸如插入序列IS*Aba-1*的可移动元件以相反方向位于该基因上游时,充当启动子序列,该基因的表达可以增加。该启动子激活染色体碳青霉烯酶的转录水平,介导更高水平的耐药[149]。

在具有碳青霉烯酶水解谱的OXA型酶中,肠杆菌科各种细菌的OXA-48和相关酶被重点关注,如OXA-162、OXA-163、OXA-181和OXA-232。OXA-48最初分离于土耳其的肺炎克雷伯菌的临床分离株[152]。产OXA-48-like酶的分离株在欧洲和地中海地区缓慢传播,现在在世界各地均有报道。产OXA-48的菌株显示升高的碳青霉烯类MICs,通常具有次要的非酶耐药机制,因此,大多数分离株的碳青霉烯类MICs中等升高[152]。该酶编码的耐药往往是低水平耐药,使得检测具有该耐药机制的菌株较为困难,并促进了该碳青霉烯酶编码基因的传播。此外,最近的动物研究表明,由产OXA-48的菌株引起的感染用临床上可用的β-内酰胺类治疗可能较为困难[153]。编码OXA-48的基因通常由Tn1999复合转座子携带,该复合转座子在碳青霉烯酶基因两侧及其他基因(如*IS1*和*lysR*)两侧具有*IS 1999*。已经证明$bla_{\text{OXA-48}}$通常由独特的IncL/M结构质粒携带,这与由多种质粒骨架携带的其他碳青霉烯酶不同。

6)碳青霉烯酶(carbapenemases):过去,获得性的水解碳青霉烯类的β-内酰胺酶很少见,但是在最近的二十年中,这些酶的出现急剧增加。碳青霉烯酶可以是丝氨酸β-内酰胺酶,包括具有碳青霉烯酶谱的苯唑西林酶(如上所述)或金属β-内酰胺酶。

丝氨酸碳青霉烯酶(Serine carbapenemases)。能够水解碳青霉烯类的Ambler分类A类酶在Bush-Jacoby-Medeiros功能分类的2f组,通常被称为丝氨酸碳青霉烯酶。该组的代表是KPC、SME、NMC-A、IMI、GES(某些变异体)、BIC-1、BCK-1和FRI-1[155-159]。在丝氨酸碳青霉烯酶中,KPC分布最广,主要在肺炎克雷伯菌中发现,但在

肠杆菌科，不动杆菌属和铜绿假单胞菌的许多其他菌种中也被发现[160]。KPC-1 最初是在美国报道的，是从北卡罗来纳州一例患者的肺炎克雷伯菌分离株中发现的，此后不久，KPC-3 也被发现[125, 161]。尽管存在许多其他 KPC 变异体，但 KPC-2 和 KPC-3 是世界范围最流行的。

KPC 的总体结构与其他 A 类酶类似，有趣的是，这种 β-内酰胺酶与 CTX-M-1、SHV-1 和 TEM-1 的蛋白质序列同源性仅占 50%、39% 和 35%[162]。KPC 型 β-内酰胺酶具有一个大而浅的活性位点，使其可以容纳较大的 β-内酰胺分子，例如头孢菌素类和碳青霉烯类。这些结构变化的结果是，KPC 被认为是一种多功能的 β-内酰胺酶[155]。KPC 型酶几乎可以水解并介导所有 β-内酰胺类耐药，产生这些酶的分离株通常具有多重耐药性，在某些情况下对所有可用的抗菌药物都有耐药性。克拉维酸或他唑巴坦不能抑制 KPC 型酶；但是，阿维巴坦能够很好地抑制 KPC[160]。

bla$_{KPC}$ 通常包含在 Tn *4401* 复合转座子的亚型中，该亚型的长度有所变化，但基因含量相似[163]。KPC 的成功传播主要归因于序列分型为 258(ST258)的肺炎克雷伯菌分离株及属于克隆复合体 11（CC11）的其他相关 ST 的传播[164]。ST258 型肺炎克雷伯菌是高风险克隆的原型，在很大程度上引起了碳青霉烯耐药在肠杆菌科的全球传播[165]。在美国、以色列、中国、巴西、德国、波兰、比利时、匈牙利、克罗地亚和英国的大多数地区都检测到了产 KPC 酶的分离株。这些基因在希腊、意大利、巴西和美国特定地区（如得克萨斯州和纽约）被认为是地方性的传播。感染控制措施减少了以色列和纽约产 KPC 酶的菌株引起感染的发生率[166-167]。

GES 酶最初被报道为 ESBLs，但单点突变（在 Ω 环的 170 位从 Gly 变为 Asp）扩展了这些酶的水解谱，使 GES-2 增加了亚胺培南酶活性[168]。其他 GES 变异体（GES-4、GES-11 和 GES-14）具有碳青霉烯酶活性[156]。NMC-A 和 IMI 酶是在阴沟肠杆菌中发现的染色体编码的碳青霉烯酶。这些酶由头孢西丁和亚胺培南诱导，并由 LysR 型调节蛋白调控[169-170]。同样，SME 是一种来自粘质沙雷菌的染色体酶，显示与 NMC-A 的最大相似性（70%）。这些酶介导对碳青霉烯类的耐药，但它们对广谱头孢菌素的水解活性有限[171]。

②金属 β-内酰胺酶（Metallo-β-lactamases）。金属 β-内酰胺酶是 Ambler 分类的 B 类和 Bush-Jacoby-Medeiros 分类的 3 组酶，具有碳青霉烯酶活性。根据它们对金属阳离子（通常是锌）的要求，分为 3 个不同的亚类。B1 酶（包括所有从脆弱拟杆菌获得的金属 β-内酰胺酶和 CcrA）具有 1 个或 2 个锌离子的活性位点。这些酶类似于 B2 酶，例如，来自嗜水气单胞菌的 CphA，它们会受到第二个附加锌离子的抑制。B3 酶与其他酶具有结构同源性，但不具有序列同源性[172]，包括来自嗜麦芽窄食单胞菌的 L1，其需要 2 个锌离子。尽管编码金属 β-内酰胺酶的基因显示出很少的一级结构序列一致性（17%～37%），但是已知的金属 β-内酰胺酶的三维结构似乎相似[172]。尽管有差异，金属 β-内酰胺酶仍显示出一些共同的特征。这些酶水解所有 β-内酰胺类，表现出出色的碳青霉烯酶活性。它们不会水解单内酰环类（氨曲南），并且可以被螯合剂（如 EDTA）抑制，但不会被克拉维酸、舒巴坦、他唑巴坦、阿维巴坦或法硼巴坦抑制。

值得注意的是，金属 β-内酰胺酶的氨基酸位置遵循基于结构比对的特定编号系统 BBL[173]。大多数已知的金属 β-内酰胺酶由染色体编码。然而，获得性的金属 β-内酰胺酶构成了重要的临床威胁，因为它们几乎水解所有的 β-内酰胺类，且不受临床可用抑制剂的抑制，并且位于可传播和携带编码对其他类抗菌药物耐药性基因的可移动遗传结构中。在获得性的金属 β-内酰胺酶中，IMP、VIM 和 NDM 变异体最为广泛，现已在全球范围内发现[174]。它们已在多种革兰阴性菌的临床分离株中发现，包括肠杆菌科，铜绿假单胞菌和不动杆菌属的一些菌种。IMP 酶是最早描述的金属 β-内酰胺酶。1988 年在日本的铜绿假单胞菌中检测到 IMP-1。进一步的研究表明，该基因在日本多家医院的其他革兰阴性菌中也存在[175]。IMP-1 仍然是全世界最常见的变异体，但是在特定区域也报道了其他类型的暴发[174]。编码 IMP 的基因是可移动的基因盒，并且大部分携带在 1 类整合子中，该整合子为可自我转移的遗传结构，可以定位在质粒或染色体。在携带其他耐药基因的这些基因盒结构中已经检测到许多其他金属 β-内酰胺酶基因。

1999 年，VIM-1 在意大利维罗纳的多重耐药

铜绿假单胞菌分离株中被报道[176]。后来在1995年和1996年分别在法国和葡萄牙分离的菌株中鉴定出了该酶的另一种亚型VIM-2[177-178]。自这些最初的报道以来，VIM酶已经变得广泛传播并且已经描述了几种变异体。产VIM的分离株在欧洲、中美洲和亚太地区的医院中引起了多次暴发[108,179]。编码VIM变异体的基因也被嵌入1类整合子中。

NDM(新德里金属β-内酰胺酶)是一种B类β-内酰胺酶，由一种可移动遗传元件编码，其传播方式比KPC基因更复杂并且更难以预测。NDM-1最初是在一名患者的肺炎克雷伯菌中报道，该患者先前曾于2007年在印度的两家不同医院接受过治疗，然后转院到瑞典，菌株在瑞典进行了鉴定和分类[180]。NDM-1的DNA序列与肠杆菌科中发现的其他常见金属β-内酰胺酶几乎没有一致性，与其最接近的VIM-1仅有32.4%的氨基酸一致性[156]。现在已经报道了许多NDM变异体，并且定位于不同的可移动结构和不同大小的质粒中。

其他获得性的金属β-内酰胺酶局限在某些地区，或已报道过一种或几种。地区限制性酶的例子包括在巴西铜绿假单胞菌中广泛传播的SPM，以及在德国铜绿假单胞菌和肠杆菌科中发现的GIM[181-182]。其他不太常见的金属β-内酰胺酶包括SIM-1、KHM-1、DIM-1、AIM-1和TMB-1[183-187]。

固有的金属β-内酰胺酶可以是组成性的或可诱导的，这些酶包括蜡样芽胞杆菌(*Bacilluscereus*)的BCII、炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)的Bla2、嗜麦窄食单胞菌的L1、嗜水气单胞菌的CphA、脑膜炎败血黄杆菌(*Chryseobacterium meningosepticum*)的BlaB或GOB-1、*Chryseobacterium indologenes*的IND-1、*Legionella gormannii*的FEZ-1、*Caulobacter crescentus* TUS-1的Mbl1B、香味菌属(*Myroides* spp.)的MUS-1，*Janthinobacterium lividum*的THIN-B、约氏黄杆菌(*Flavobacterium johnsoniae*)的JOHN-1，以及居泉沙雷菌(*Serratia fonticola*)的SFH-1[108,172-173]。来自蜡样芽胞杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、嗜水气单胞菌和简氏气单胞菌(*Aeromonas jandaei*)的酶是可诱导的。

(三)喹诺酮类耐药(quinolone resistance)

氟喹诺酮类药物的主要耐药机制是在DNA合成过程中靶标的改变。多年来，人们一直认为，突变驱动的改变是对这类药物的唯一耐药机制，因为氟喹诺酮类药物是合成分子，只有暴露于这些药物才产生选择耐药[188]。出乎意料的是，质粒介导的氟喹诺酮耐药决定簇在20世纪90年代后期被发现[189]，现在这些耐药决定簇至少包括3类：①靶标保护(Qnr家族)；②药物的外排(Qep、OqxAB和QacBⅢ)；③药物的修饰[AAC(6′)-Ⅰb-cr]。另外，氟喹诺酮类药物的耐药可能是由于革兰阳性菌和革兰阴性菌中外膜蛋白的表达减少或丢失或染色体外排系统过表达导致细胞通透性改变而引起。

1. 靶标酶的改变 氟喹诺酮类药物的靶标包括2个负责DNA超螺旋的2型拓扑异构酶，每个包括2个亚基：DNA回旋酶具有GyrA和GyrB亚基(金黄色葡萄球菌中称为GrlA和GrlB)，拓扑异构酶Ⅳ具有ParC和ParE[188]。氟喹诺酮分子对2个靶标的亲和力有所不同，在一定程度上解释了这些化合物针对不同细菌物种的不同能力。对特定氟喹诺酮类化合物发挥最大亲和力的酶称为主要靶标[190]。通常，DNA回旋酶是革兰阴性菌中氟喹诺酮类药物的主要靶标，拓扑异构酶Ⅳ是革兰阳性菌中氟喹诺酮类药物的主要靶标[191]。所有氟喹诺酮类药物的抗菌活性均受突变影响，但可能不会导致MIC达到所有氟喹诺酮类药物都耐药的水平[192]。

引起对氟喹诺酮类药物耐药的氨基酸替代位于含有活性位点酪氨酸的区域，该区域与GyrA氨基末端结构域的第67～106位残基(大肠埃希菌编号)，和ParC第63～102位残基(大肠埃希菌编号)的断裂DNA链共价连接。这些结构域称为喹诺酮耐药决定区(quinolone resistance-determining region，QRDR)[193]。耐药相关突变最常见的残基可能是GyrA的丝氨酸第83位和天冬氨酸第87位，ParC的丝氨酸第79位和天冬氨酸第83位[25]。GyrB和ParE的突变远不如其伴侣亚基的突变常见，并且常集中在亚基的中部[194]。

单一QRDR改变通常会导致MIC增加8到16倍，但很少影响药敏到产生耐药[191]。细菌逐步获得QRDR突变，直到最终它们积累足够的突变使MIC达到耐药折点才逐步被发现[192]。此外，大多数高水平耐药菌株在GyrA和ParC酶中均表现出一种以上的突变。尽管一般遵循此规则，

但单一突变也会导致某些菌种的喹诺酮 MIC 显著提高，例如金黄色葡萄球菌或铜绿假单胞菌和环丙沙星组合[195]。

实验数据表明，每 10^6～10^9 中有一个细菌发生点突变。主要靶标酶中单一点突变介导的耐药水平取决于突变产生的酶亲和力降低，以及氟喹诺酮对次级靶标的亲和力。推测对两个 2 型拓扑异构酶靶标都表现出强亲和力的氟喹诺酮类药物不太可能与耐药菌株的出现有关，因为即使主要靶标突变，保留的对次级靶标的活性也足以抑制细菌[192]。

2. 质粒介导的喹诺酮耐药 最早描述的也是最常见的质粒介导的喹诺酮耐药机制是 Qnr 蛋白对拓扑异构酶的保护[196]。Qnr(代表"喹诺酮耐药性")属于五肽重复蛋白家族，其基因存在于各种细菌的染色体或促进其传播到其他菌种的可遗传移动元件中[197]。这些基因位于 *sulI* 型整合子，插入元件或许多不相容类型且编码对其他抗菌药物的耐药基因有关的质粒中，从而介导细菌多重耐药表型[198]。

至少六个主要的 Qnr 家族被报道，这些家族通过遗传元件移动和传播：包括 QnrA、QnrB、QnrC、QnrD、QnrS 和 QnrVC[199]。其中，QnrA、QnrB 和 QnrS 具有最多的变异体，并且分布更广。固有 *qnr* 基因也引起低水平耐药，通常根据所分离菌种的首字母缩写来命名，例如，粪肠球菌的 Ef*sqnr*、*Profundum Profundum* 的 Pp*qnr*、副溶血弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*）的 Vp*qnr*、黏质沙雷菌的 Sma*qnr* 和嗜麦窄食单胞菌的Sm*qnr*[200]。在就 Qnr 基因命名达成共识之前鉴定的基因中发现了该建议的例外情况，基于耻垢分枝杆菌的另一种 Qnr 样蛋白 MfpA 对 Qnr 功能和结构进行了许多研究[199]。固有 Qnr 基因也存在于海藻希瓦菌(*Shewanella algae*)、亮弧菌(*Vibrio splendidus*)、东方弧菌(*Vibrio orientalis*)和霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)中，这些基因分别被鉴定为 QnrA、QnrS 和 QnrC 的祖先[201-203]。Qnr 介导低水平的耐药，并且使 MIC 增加 2～32 倍[199]。当其他机制，如 QRDR 改变，存在于同一细菌中时，这些基因的存在可以促进临床耐药的出现。Qnr 的保护作用对 2 型拓扑异构酶具有特异性，即使喹诺酮浓度升高，这些蛋白质也能够保护拓扑异构酶靶标。

AME AAC(6′)-Ⅰb-cr 也可以引起质粒介导的氟喹诺酮耐药[62]。该乙酰基转移酶变异体能够在第二个氨基氮 N4 处乙酰化妥布霉素、卡那霉素、阿米卡星及喹诺酮分子，从而介导低水平的耐药[63]。缺少这种变异体的左氧氟沙星和其他喹诺酮类不受该酶的影响，该酶修饰了环丙沙星和诺氟沙星。与其祖先 AAC(6′)-Ⅰb 相比，AAC(6′)-Ⅰb-cr 仅显示 2 个氨基酸变化（Trp102Arg 和 Asp179Tyr)，并且它已成为氨基糖苷类耐药分离株中最主要的变异种(M. Castanheira，未发布的数据)。

QepA 是 MFS 转运蛋白的跨膜蛋白成员，已在肠杆菌科细菌中被发现[204]。该泵外排亲水性氟喹诺酮类药物(环丙沙星、恩诺沙星和诺氟沙星)，使 MIC 增加 2～64 倍。QepA 与放线菌的膜转运蛋白具有显著的氨基酸一致性[205]。在肠杆菌科细菌的质粒和染色体中也发现了 RND 家族的另一种外排系统，称为 OqxAB[206]。该泵具有广泛的底物特异性，包括喹诺酮类、氯霉素和甲氧苄啶[206]。该基因的表达受 *rarA* 和 *oqxR* 调控，在喹诺酮耐药的菌株中 MIC 可以增加 20 倍[199]。质粒介导的 Qac 变异体 QacBⅢ是一个 MFS 外排系统，介导金黄色葡萄球菌对喹诺酮类药物的耐药[207]。

3. 因摄取和外排减少而产生的耐药 氟喹诺酮类药物通过外膜蛋白或孔蛋白穿透革兰阴性菌的外膜[208]。这些特定孔蛋白的缺乏或表达降低会影响药敏水平[209]。在减少氟喹诺酮类的细胞内积累中更重要的是外排系统的表达[25]。已证明在金黄色葡萄球菌中过表达 NorA、NorB 或 NorC MFS 系统会导致氟喹诺酮类 MICs 升高 4～8 倍[210-211]。NorA 仅影响亲水性喹诺酮类药物，例如环丙沙星和诺氟沙星，而其他外排泵也影响疏水性喹诺酮类药物(如莫西沙星)[191]。

在革兰阴性菌中，RND 家族泵调节基因的突变会增加泵的表达，产生耐药性[212]。在肠杆菌科中介导氟喹诺酮类耐药的主要外排系统是 AcrAB-TolC，调控子 MarR 和 SoxRS 的突变会增加大肠埃希菌和其他菌种喹诺酮的 MIC[213]。在铜绿假单胞菌中，MexAB-OprM 是 AcrAB-TolC 的同源物，调控子 MexR 的突变与临床分离株的喹诺酮耐药有关。以喹诺酮类为底物的其他铜绿假单胞菌外排系统有 MexCD-OprJ、MexEF-OprN

和 MexXY-OprM[214-215]。外排泵的过表达通常仅介导氟喹诺酮类药物低水平耐药。然而，它们的表达可能会放大拓扑异构酶基因内的点突变所介导的耐药水平，并可能增加氟喹诺酮类使用导致选择性耐药突变体产生的风险[191]。

(四)四环素耐药(tetracycline resistance)

四环素是抑菌性抗菌药物，通过与核糖体结合，阻止蛋白质合成来抑制细菌生长。它们结合到 30S 核糖体亚基的 A 位点，阻止了氨基酰基 tRNA 进入 mRNA 核糖体复合物，最终阻止氨基酸形成新的多肽[216]。核糖体靶标在细菌中高度保守。因此，四环素类具有广泛的抗菌活性，包括许多革兰阳性菌、革兰阴性菌、厌氧菌和非典型病原体。四环素广泛用于治疗人类和动物的感染，以及促进家畜的生长，与多种耐药决定簇的出现和传播有关[217]。大多数四环素特异性耐药决定簇分为两类：外排或核糖体保护。不同耐药基因的名称使用前缀 *tet* 或 *otr*，字母(如 A)表示不同的基因，并且由于耐药基因的数量现在超过了字母表中字母的数目，因此开始使用数字的命名系统(表 71-3)[218]。两种类型的四环素耐药基因均可在革兰阳性和革兰阴性病原菌中找到。其他机制是活性位点 rRNA 突变和四环素修饰酶。

表 71-3 在特定病原体中的四环素特异性耐药基因[a]

属	耐药基因	耐药机制
肠球菌	*tet*(K)、*tet*(L)、*tet*(58)	外排
	tet(M)、*tet*(O)、*tet*(S)、*tet*(T)	核糖体保护
	tet(U)	未知功能
葡萄球菌	*tet*(K)、*tet*(L)、*tet*(38)、*tet*(42)、*tet*(43)	外排
	tet(M)、*tet*(O)、*tet*(S)、*tet*(W)、*tet*(44)	核糖体保护
	tet(U)	未知功能
链球菌	*tet*(K)、*tet*(L)、*tet*(40)、*tetAB*(46)	外排
	tet(M)、*tet*(O)、*tet*(Q)、*tet*(S)、*tet*(T)、*tet*(W)、*tet*(32)	核糖体保护
	tet(U)	未知功能
不动杆菌	*tet*(A)、*tet*(B)、*tet*(G)、*tet*(H)、*tet*(L)、*tet*(39)、*tet*(Y)	外排
	tet(M)、*tet*(O)、*tet*(W)	核糖体保护
克雷伯菌	*tet*(A-E)、*tet*(L)	外排
	tet(M)、*tet*(S)、*tet*(W)	核糖体保护
	tet(X)	酶修饰
肠杆菌	*tet*(A-D)、*tet*(G)、*tet*(L)、*tet*(39)	外排
	tet(M)	核糖体保护
	tet(X)	酶修饰
埃希菌	*tet*(A-E)、*tet*(G)、*tet*(J)、*tet*(L)、*tet*(Y)	外排
	tet(M)、*tet*(W)	核糖体保护
	tet(X)	酶修饰
嗜血杆菌	*tet*(B)、*tet*(K)	外排
	tet(M)	核糖体保护

注：[a] 数据来源于参考文献[422]和[423]

1. 四环素特异性外排 四环素外排蛋白都是膜相关的，并且是 MFS 泵的成员。它们通过将质子交换为四环素阳离子复合物来将四环素从细胞中排出，从而防止四环素在细胞内的积累达到足以完全抑制其核糖体靶标的水平。这些 MFS 泵是四环素-H^+ 反转运蛋白，通过质子交换四环素分子起作用，驱动四环素逆化学浓度梯度的运输，在这种情况下，四环素从细胞质穿过内膜进入内膜和外膜之间的周质空间[219]。表 71-3 列出了病原菌中常见的泵。四环素特异性外排泵位于细菌

的内(细胞质)膜中。在革兰阴性病原菌中发现的泵具有12个跨膜区[219]。在大多数情况下,四环素特异性外排泵基因位于可移动遗传元件上,并且是水平获得的耐药基因。质粒编码的Tet(A)是1980年发现的第一个细菌抗菌药物外排泵,现在在重要的革兰阴性病原菌中分布最广[219-220]。编码Tet(A)和Tet(B)外排泵的基因很可能是从龟裂链霉菌(*Streptomyces rimosus*)转移的,后者产生天然产物土霉素,以保护产生抗菌药物的生物免受其生产的四环素的影响[221]。诸如*tet*(A)之类的基因通常包含在克隆质粒载体中,并用作细菌基因工程中的抗菌药物选择标记。编码四环素特异性外排泵的基因通常伴随着*tet*(R),后者编码一个四环素反应性抑制子,该抑制子通过对四环素暴露的诱导反应来控制Tet(A)外排泵的表达[222]。在革兰阴性菌中,Tet(R)蛋白通过与*tet*(A)上游的串联操纵子序列结合为同源二聚体,阻断其表达来抑制*tet*(A)的表达[223]。结合四环素后,Tet(R)从DNA解离,从而使*tet*(A)发生转录。革兰阳性菌外排基因与特定的蛋白抑制子无关,但序列分析表明这些决定簇可能受与翻译衰减(translational attenuation)相似的机制调控[224]。通常,外排蛋白介导四环素耐药,但不影响米诺环素和多西环素[217]。该规则的唯一例外是革兰阴性菌的Tet(B)蛋白,该蛋白介导了对四环素和米诺环素的耐药。

2. 核糖体保护 核糖体保护蛋白(ribosome protection proteins,RPPs),例如,由*tet*(M)和*tet*(O)编码的蛋白是四环素耐药的另一主要机制,并介导第一代四环素类及米诺环素和多西环素的耐药(表71-3)。它们通过与核糖体结合而起作用,从而改变其构象并抑制四环素的结合。Tet(M)和Tet(O)是这些蛋白质的最佳代表。编码RPPs的基因在细菌中很普遍,在许多情况下,是由于它们位于宿主范围广泛的可接合转座子中[217]。像外排蛋白一样,四环素的存在时,核糖体保护蛋白被上调[225]。质粒携带的*tet*(O)最早在空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)的临床分离株中报道[226]。*tet*(O)基因与产生四环素的龟裂链霉菌的*otr*(A)具有相似性,这表明核糖体保护也可能起源于保护产四环素的生物体的机制[227]。RPPs是与延伸因子EF-G和EF-Tu具有同源性的GTP酶[228]。RPPs与50S核糖体亚基上的位点结合,类似于EF-G所使用的位点,随后导致四环素从核糖体中释放出来[229]。尽管RPPs的结合位点与30S核糖体mRNA上的四环素结合位点相距较远,但结合会导致核糖体的整体构象变化,足以使结合的四环素从核糖体复合物中移出。随后刺激了tRNA与A位点的结合,这也减少了四环素的重新结合[230]。使用冷冻电子显微镜对结合到70S核糖体的Tet(O)和Tet(M)进行建模的最新信息表明,RPPs还可直接阻断位于16S rRNA残基C1054周围的四环素的结合位点[231-232]。

3. 酶灭活 另一种特异性降低四环素敏感性的机制已经确定。使用这种机制的第一个酶是TetX,它是脆弱拟杆菌中的转座子编码的[233]。这些酶是单加氧酶,通过使四环素分子羟基化而起作用,从而阻止了镁的结合,而镁是核糖体结合所必需的辅助因子[234]。羟基化的四环素不稳定并且随后分解。TetX与四环素分子的核心相互作用,解释了为什么它可以作用于所有四环素类,包括替加环素和依拉环素(eravacycline)[235]。TetX仅在氧气存在下起作用。正如主要在脆弱拟杆菌中发现的那样,这意味着TetX在这些专性厌氧菌的耐药中不起作用。但是,*tet*(X)基因最近在替加环素耐药的鲍曼不动杆菌中发现。这些酶尚未成为对替加环素耐药的主要来源,但应对此进行监测。

4. RND型外排介导的耐药 所谓的第三代四环素替加环素(甘氨酰环素)、依拉环素(氟洛环素)和奥马环素(omadacycline)(氨基甲基环素)旨在规避由常见的四环素特异性外排或核糖体保护机制引起的耐药,这些机制介导对早期四环素类的耐药[236-237]。但是,TetA蛋白中对于识别替加环素和依拉环素重要的氨基酸残基的某些变化可能会对这两种新四环素类的敏感性产生适度的影响[235]。一些细菌种类,尤其是铜绿假单胞菌、奇异变形杆菌和摩氏摩根菌,对替加环素具有固有耐药,因为它们表达的是能有效排出抗菌药物的RND型外排泵[238-240]。尽管尚未鉴定,但奥马环素也显示出对变形菌属的活性降低,可能是由于相同的机制所致[241]。其他革兰阴性菌对替加环素的耐药也有报道,通常是由于转录激活因子(如RamA或MarA)的过表达引起[239,242-243]。这些转录激活

因子用于激活通常被抑制的 AcrAB 型 RND 外排，导致 RND 外排高水平表达。在产 KPC 的肺炎克雷伯菌中，与 AcrAB 外排系统表达增加相关的 RamR 突变与替加环素耐药有关[244]。此外，在多重耐药肺炎克雷伯菌中发现了一种新的外排泵，名为 KpgABC，与替加环素耐药有关[245]。鲍曼不动杆菌中 AdeABC 的过表达也与替加环素的敏感性降低有关[246]。

5. 基于靶标的耐药　基于靶标的对四环素的耐药已被报道，但是它仍然很少见，因为大多数细菌物种都包含 rRNA 基因的多个拷贝。最初在携带低拷贝数基因的菌种中发现了这种耐药，例如痤疮丙酸杆菌和幽门螺杆菌[247-248]。淋病奈瑟菌中的高水平四环素抗性是由 *rpsJ* 基因中的单一点突变（Val57Met）引起的，该基因编码 30S 核糖体蛋白 S10[249]。最近，产 KPC-2 的 ST512 型肺炎克雷伯菌对替加环素低水平耐药，也与核糖体蛋白 S10 的与淋病奈瑟菌相同的突变有关。这是在肠杆菌科中首次报道的基于靶标的对四环素耐药的实例。有趣的是，该分离株的 *rpsJ* 序列与来自 NIH 的产 KPC-2 肺炎克雷伯菌的暴发菌株的基因组序列相匹配[250]。据报道，某些肺炎克雷伯菌分离株对替加环素耐药。但是，该机制以前没有被报道。*rpsJ* 基因的耐药突变体可对替加环素敏感性降低，在屎肠球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和鲍曼不动杆菌可通过体外实验选择耐药突变体[251]。此外，一株屎肠球菌的临床分离株在 S10 中具有相同的 Val57Met 取代，也与替加环素的耐药相关[252]。

（五）多黏菌素 B 和多黏菌素 E（黏菌素）的耐药［polymyxin B and polymyxin E (colistin) resistance］

多黏菌素类，包括黏菌素（多黏菌素 E）和多黏菌素 B，经常用于由多重耐药革兰阴性菌引起的感染的联合治疗。多黏菌素类通过阳离子肽与脂多糖（LPS）上负电荷的相互作用而起作用，脂多糖形成了革兰阴性菌的外膜[253]。多黏菌素的结合被认为取代了交联相邻 LPS 分子的二价阳离子 Mg^{2+} 和 Ca^{2+}。这破坏了外膜的渗透屏障，继而增加了多黏菌素的吸收。变形杆菌属、普罗威登斯菌属、奈瑟菌属、沙雷菌属、伯克霍尔德菌属和一些肠杆菌属的细胞壁可阻止药物进入细胞膜，显示多黏菌素类的固有 MIC 升高[254]。革兰阳性菌不具有外膜，因此具有固有耐药。

LPS 的修饰在细胞壁上产生净正电荷，从而降低了多黏菌素类与细胞膜的相互作用，从而引起对该药物的耐药[255]。这是在临床分离株中检测到的主要耐药机制，包括大肠埃希菌、鼠伤寒沙门菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、不动杆菌属和许多其他致病性革兰阴性菌[254]。在 LPS 修饰中，最常见和最有效的改变是将 4-氨基-4-脱氧-L-阿拉伯糖（L-4Ara4N）共价添加到脂质 A 中，然后添加磷酸乙醇胺（PEtN）（图 71-3）。L-4Ara4N 和 PEtN 的添加是由双组分系统 PhoB-PhoQ 和 PmrA-PmrB 介导的。PmrA-PmrB 导致 *pmrCAB* 和 *arnBCADTEF-pmrE*（也称为 *pmrHFIJKLM-ugd*）的上调，它们介导 L-4Ara4N 和 PEtN 向脂质 A 分子的转移。PhoB-PhoQ 通过 PmrD 间接激活 PmrA-PmrB，从而启动上述事件。影响多黏菌素耐药革兰阴性菌中这些调节系统的几种突变已被报道[254]。MgrB 是一种小的跨膜蛋白，对 PhoP-PhoQ 产生负反馈并导致 PhoP 调控的基因的过表达，其有害的突变和破坏最近已被认为是肺炎克雷伯菌临床分离株中黏菌素耐药的重要机制[256]。

革兰阴性菌利用其他 LPS 介导的机制介导多黏菌素耐药的例子有肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌和肠炎沙门菌中 *lpxM* 引起的脂质 A 的酰化，肺炎克雷伯菌中的双组分系统 CrrAB 对 LPS 的糖基化，不动杆菌属中 LPS 的缺失[257-258]。此外，还有非 LPS 耐药机制，包括外膜蛋白表达的变化和外排泵的过表达[254]。降低外膜负电荷的 OMPs 的过表达被认为是铜绿假单胞菌和霍乱弧菌产生了多黏菌素耐药的原因[259]。

2015 年，来自中国的大肠埃希菌中鉴定出了一种质粒携带的基因，该基因介导多黏菌素低水平耐药[260]。该基因的产物与在 *Paenibacillus sophorae* 和 *Enhydrobacter aerosaccus* 中发现的磷酸乙醇胺转移酶（EptA）具有 63%的一致性[260]。自从发现以来，已经有数百份关于 *mcr*-1 及其变异体在临床、环境、家畜和食物样品中的肠杆菌科细菌中检出的报道[261-262]。证据表明由于多黏菌素在兽药中被广泛用于治疗肠杆菌科细菌引起的家畜胃肠道感染，*mcr* 基因已经悄然传播[263-264]。另外，携带 *mcr* 的菌株经常携带其他耐药基因，例

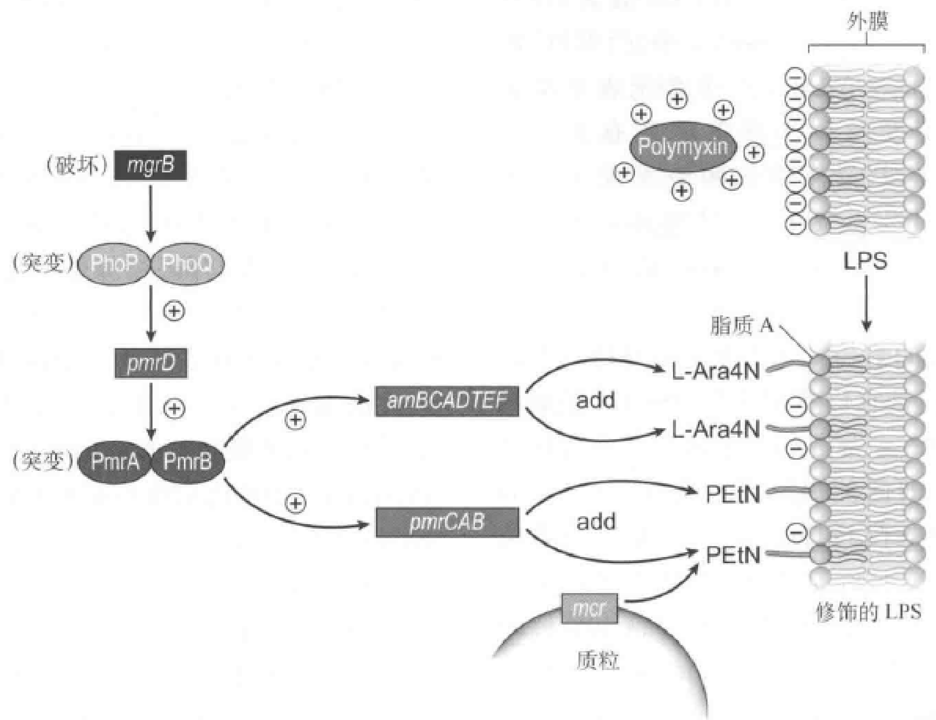


图 71-3 引起革兰阴性菌对多黏菌素类耐药与 LPS 修饰有关的基因和双组分系统。最右上角的 LPS 带负电，并与阳离子分子(如多黏菌素类)相互作用。由于在脂质 A 中添加了 L-4Ara4N 或 PEtN，修饰的 LPS 表现出较少的负电荷。该修饰的 LPS 对阳离子分子的亲和力降低。LPS 的改变可能是由 *mgrB* 编码的调节子的破坏或 *phoP-phoQ* 或 *pmrA-pmrB* 上的突变引起的，这些突变刺激了 *pmrCAB* 和 *arnBCADTEF* 的活性，添加了 L-4Ara4N 和 PEtN。质粒携带的 *mcr* 基因也可将 PEtN 添加到脂质 A 中

如，编码 ESBL 和碳青霉烯酶的基因，以及编码对其他种类的抗菌药物耐药的基因。

(六)呋喃妥因耐药(nitrofurantoin resistance)

呋喃妥因是一种主要用于治疗尿路感染的合成抗菌药物[265]。呋喃妥因杀死细菌的能力与细菌硝基还原酶的存在有关，后者会将呋喃妥因转化为对细菌有毒的高反应性亲电子中间体，非特异性地攻击细菌核糖体蛋白，导致蛋白合成的完全抑制[266]。在大肠埃希菌中，硝基还原酶是由染色体 *nfnA* 和 *nfnB* 基因编码的 1 型氧不敏感酶，因此，这些基因中的突变与呋喃妥因的 MIC 升高有关[267]。通过减少硝基还原酶活性对呋喃妥因的耐药性可能会严重损害其适应性[267]。此外，尽管迄今为止尚未在临床分离株中检测到这些突变，但实验室数据表明核黄素生物合成所需的编码二氧四氢蝶啶合成酶的 *ribE* 的缺失会增加呋喃妥因的 MIC[268]。

已经检测到质粒介导的呋喃妥因的耐药。丹麦农场的猪粪中分离的多重耐药大肠埃希菌中检测到 RND 型外排泵 OqxAB，该农场使用了喹乙醇(Olaquindox)作为饲料添加剂，对呋喃妥因具有交叉耐药性[269]。与大多数 RND 型外排泵一样，OqxAB 具有广泛的底物特异性，除了呋喃妥因以外，还包括喹乙醇、氯霉素、环丙沙星、萘啶酸、甲氧苄啶和消毒剂(如苯扎氯铵、西替米特和洗必泰)[270]。*OqxAB* 基因已在大肠埃希菌和肠炎沙门菌的质粒上(基因两侧有 IS *26* 元件)，以及不含 IS *26* 元件的克雷伯菌属的天然染色体上被发现[271]。总体而言，在大肠埃希菌的泌尿道分离物中，呋喃妥因的耐药性仍然很低[272]。

(七)氯霉素耐药(chloramphenicol resistance)

1. 乙酰转移酶 氯霉素是一种广谱抗菌药物，具有明确的血液毒性，由于其他低毒性治疗方法的存在，近年来在发达国家鲜有使用。氯霉素耐药最常见机制是产生 CATs，CAT 通过酶的乙酰化作用使氯霉素失活。氯霉素含有 2 个羟基，在 CAT 催化反应中被乙酰化，乙酰辅酶 A 作

为反应的酰基供体。C-3羟基首先乙酰化，产生3-乙酰基-氯霉素[273]。随后与1-乙酰基-氯霉素非酶重组并二次乙酰化，生成1,3-二乙酰基-氯霉素产物。单酰基和双酰基衍生物均不能与核糖体50S亚基结合，也不能抑制原核生物转肽酶活性[273]。

在革兰阳性和革兰阴性病原菌中都报道了大量的CAT基因，这些基因通常使表达它们的生物体具有极高的耐药水平。尽管不同CAT变异体的核苷酸序列可能差异很大，但它们之间存在大量的结构相似性[274]。在所有当前已知的A型CAT中，某些氨基酸都与底物结合，催化活性，单体折叠或单体组装成三聚体有关，这些氨基酸似乎是保守的[275]。

CATs可大致分为2类：A类（经典型）CATs和B类（异生型）CATs[275]。在金黄色葡萄球菌中，存在5种结构相似的A类CATs（由原型质粒pC194编码的A、B、C、D和E型）[276]。编码这些酶的*cat*基因常位于小的多拷贝质粒上，其表达受翻译衰减（translational attenuation）机制诱导[275]。粪肠球菌和肺炎链球菌也表达可诱导的CAT基因，这与金黄色葡萄球菌的D型CAT基因相似。产气荚膜梭菌中存在两种*cat*基因编码的固有CAT表达。*catP*通常位于转座子Tn *4451*，而*catQ*（与艰难梭菌*catD*极其相似）位于染色体[275]。*catQ*也已在肺炎链球菌的临床分离株中发现，并与大环内酯外排泵基因*mef*（Ⅰ）遗传相关[277]。

革兰阴性细菌A型CATs可分为3类（Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ）。广泛流行的Ⅰ类酶的特征是：可结合并抑制夫西地酸的活性（不需要乙酰化）。这些酶常与转座子Tn *9*或相关元件有关。Ⅱ类CATs因其对硫醇反应性药物的抑制敏感性及与流感嗜血杆菌的关联而受到关注[278]。由于Ⅲ类酶的三级结构已研究得较为透彻，因此关于A类CAT酶结构特征的认知大部分来自于Ⅲ类酶[274]。此类酶与不同底物结合的结构因素也已被认知。

B型（异生型）乙酰转移酶与经典型CATs没有结构相关性，其中一些酶已被证实可以使氯霉素乙酰化，但即使以高拷贝量存在时也仅形成低水平氯霉素耐药[274]。这些酶天然底物可能并不是氯霉素，这就解释了其对氯霉素酰化能力有限的原因。这些酶最初发现于根癌农杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*），现在已可见于许多不同的菌种[273]。此类酶还包括金黄色葡萄球菌和屎肠球菌中的维吉霉素乙酰转移酶（见下文奎奴普丁-达福普汀耐药）。事实上，虽然此酶属于B型酶，但*vat*基因并不介导氯霉素耐药，在体外也不能乙酰化氯霉素[276]。然而，这些酶对链霉素的乙酰化能力很强。现已发现2种三聚体型B型CATs的晶体结构[279-280]。

2. 氯霉素累积减少 氯霉素现在被公认为是革兰阳性菌和革兰阴性菌，包括大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、枯草芽胞杆菌和金黄色葡萄球菌中许多MDR外排泵的底物，如RND型外排泵AcrAB-TolC和MexAB-OprM[56,281]。此外，还有氯霉素特异的外排系统。第一个被发现的氯霉素特异性外排基因是位于铜绿假单胞菌转座子Tn *1696*的整合子In *4*上的*cmlA*[282]。*cmlA*基因编码的外排机制以氯霉素为底物，而不是以氟洛芬（一种氯霉素衍生物，美国批准用于动物，治疗牛呼吸道致病菌感染）为底物。*clmA*的相应蛋白由419个氨基酸组成，具有12个跨膜结构域，因此，它与MFS的其他跨膜转运蛋白非常相似[283]。在链霉菌属中也发现了由*cmlR1*和*cmlR2*编码的这种外排泵的衍生物，表明这些基因可能从产生抗菌药物的生物转移到了致病菌中[284]。革兰阴性菌也表达氯霉素和氟洛芬特异性的外排基因（*floPp*、*floSt*和*floR*）。这些耐药基因在动物源性大肠埃希菌和沙门菌属中被发现的频率逐渐增高[285-287]。事实上，多重耐药肠沙门菌鼠伤寒血清型DT104对氯霉素耐药通常由*floSt*编码[285]，这再次强调了人和动物之间使用相似抗菌药物的潜在不良影响。最近研究发现，鲍曼不动杆菌对氯霉素耐药与MFS型外排泵CraA有关[288]。

（八）利福平耐药（rifampin resistance）

利福平对革兰阳性菌和分枝杆菌特别有效。它通过抑制由*rpoB*编码的细菌DNA依赖性RNA聚合酶亚基B起作用，导致染色体*rpoB*基因中心区错义或短片段缺失的点突变介导了大肠埃希菌对利福平的耐药[289]。利福平耐药性在结核分枝杆菌中尤为重要，因为利福平仍是用于治疗的药物之一。在这种生物中，96%利福平耐药的临床分离株中在*rpoB*的81 bp区域发生了突

变,改变其结合 DNA 的亲和力[290]。这些点突变的发生频率排除了使用利福平作为单一药物治疗细菌感染的可能性。介导利福平耐药的突变会导致细菌的适应性代价[291]。介导利福平耐药的突变也导致对其他利福霉素的耐药[292]。

(九)复方磺胺甲噁唑耐药(trimethoprim-sulfamethoxazole resistance)

自 20 世纪 40 年代以来,叶酸生物合成途径的抑制剂已在临床实践中成功使用[293]。叶酸途径对于细菌生长至关重要,因为它是几种氨基酸和嘌呤的合成所必需的。叶酸途径的功能取决于四氢叶酸的可用性,因为细菌无法吸收预先形成的叶酸,因此必须依靠其能力合成。磺胺甲噁唑和甲氧苄啶是两种酶的抑制剂[二氢叶酸合成酶(DHPS)和二氢叶酸还原酶(DHFR)],而这两种酶在四氢叶酸的合成过程中依次发挥作用。由于哺乳动物细胞是外源性获得叶酸,因此,抑制二氢叶酸合成的这些步骤对细菌具有高度选择性[293]。目前认为这两种抑制剂协同作用抑制叶酸合成。

对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑的固有耐药相对罕见,可能是由于与靶标酶的接触减少(铜绿假单胞菌)[294],低亲和力 DHFR 酶(奈瑟菌属、梭菌属、布鲁菌属、拟杆菌属、卡他莫拉菌和诺卡菌属)[295],吸收外源叶酸(肠球菌属和乳杆菌属)[296]或吸收胸腺嘧啶(肠球菌属)[297]。铜绿假单胞菌与靶标酶的接触减少与细胞渗透屏障和细胞主动外排均有关[298-299]。

已经报道了甲氧苄氨嘧啶和磺胺甲噁唑的突变耐药,并且涉及多种机制[300-301]。分别编码 DHFR 和 DHPS 的 *dfrB* 和 *folP* 的染色体突变,可导致多种菌种的高水平耐药[302]。此外,导致 DHFR 过量产生的启动子突变(在大肠埃希菌中),导致耐药的 *dhfr* 基因内的点突变(在金黄色葡萄球菌和肺炎链球菌中),或两种机制兼有(在流感嗜血杆菌中)都有报道[303]。低亲和力 *dhfr* 基因的获取更为常见,大约 20 个已被报道[300]。在革兰阴性菌的质粒中最常见的是 *dhfr* Ⅰ基因和 *dhfr* Ⅱ基因变异体的表达,表达导致的耐药水平增加程度明显超过了临床可达到的药物浓度。在某些菌种中也描述了介导磺胺耐药的染色体 *dhps* 基因内的点突变或小的 DNA 片段的插入。对于脑膜炎奈瑟菌和化脓性链球菌,*dhps* 基因内导致耐药的变化范围更大。在这些情况下,更大的变化要通过从其他物种中转化和重组获得至少部分 *dhps* 基因[304]。

质粒介导的对磺胺类的可转移耐药在革兰阴性菌中已被报道[301]。与 *dhfr* 基因的多样性不同,仅报道了 2 个获得性的低亲和力 *dhps* 基因(*sul* Ⅰ 和 *sul* Ⅱ)[305]。介导磺胺耐药的基因通常被整合到多重耐药的整合子中,而整合子本身通常被整合到可转移的质粒中。这些耐药质粒的可转移性,以及与其他耐药基因的频繁关联,在一定程度上解释了对该抗菌药物组合耐药性的广泛性和持久性。一种甲氧苄啶-磺胺甲噁唑耐药的大肠埃希菌在美国广泛传播,至少在两个州的年轻女性中引起泌尿道感染[306],尽管最近的数据表明,这种广泛流行可能更多是由于相关菌株的同时出现,而不是直接暴发菌株的传播[307]。

三、针对革兰阳性菌抗菌药物的耐药

(一)达托霉素耐药(daptomycin resistance)

达托霉素是一种环脂肽类抗菌药物,仅对革兰阳性菌有效。对大多数菌株有杀菌活性,在生理浓度的钙离子存在条件下,与钙离子相互作用,在靶细菌胞膜上形成小孔,使胞内离子外漏,从而导致细菌死亡。达托霉素耐药很罕见,但已经发现有肠球菌和葡萄球菌对其耐药[308]。

金黄色葡萄球菌对达托霉素的敏感性降低常发生在达托霉素长期治疗深部感染的过程中[309]。达托霉素的耐药机制涉及细胞膜的复杂变化,包括磷脂含量、流动性和表面电荷的改变[310]。对达托霉素非敏感金黄色葡萄球菌进行全基因组测序,发现有 *mprF*、*pgsA* 或 *cls2* 基因的缺失,这些基因编码磷脂合成,还可能减少细胞膜的负电荷,引起对达托霉素的静电排斥力[311]。*dltA* 的失调也可能引起细胞膜净正电荷的变化,这与将带正电荷的氨基酸 D-丙氨酸引入细胞壁的磷壁酸有关[312]。在 *mprF* 突变的金黄色葡萄球菌中,*vraSR*(万古霉素耐药相关感应子/调节子)信号通路在达托霉素耐药表达中发挥作用[313-314]。在很多达托霉素非敏感和万古霉素中介的金黄色葡萄球菌中发现细胞壁增厚,但是两者的耐药机制

可能并不相同，因为细菌可能只对两种药物中的一种不敏感[311, 313, 315]。

在粪肠球菌中，达托霉素耐药与磷脂代谢基因(*gdpD*、*cls*)的缺失有关。此外，在 *liaF* 中发现了突变，该基因被认为是 LiaFSR 系统的一部分，可调控对抗菌疗法的应激反应[317]。此外，研究表明，通过改变 GdpP 活性或通过 LiaFSR 系统发出信号，调节环状 di-AMP 库与抗菌药物诱导的细胞膜应激反应密切相关，从而导致肠球菌对达托霉素耐药[318]。达托霉素耐药的屎肠球菌的全基因组测序表明，YycFG 双组分调节系统[(类似于 LiaFSR 系统)]发生了变化，并且涉及磷脂代谢的基因发生了突变[319]。最近，磷脂酰胆碱基转移酶(cdsA)的变化导致缓症链球菌对达托霉素耐药[320]。无论涉及哪个基因，达托霉素的耐药通常都是多因素的，而且没有一个突变可以与耐药表型联系起来[312]。

(二)糖肽类耐药(glycopeptide resistance)

糖肽类抗菌药物(万古霉素和替考拉宁)与被运送至细胞质膜的五肽肽聚糖前体分子结合，抑制细胞壁的合成。这种结合阻止了正常、稳定的细胞壁形成所必需的肽聚糖前体的交联(转肽作用)。大分子量的糖肽分子似乎也可以通过空间位阻来抑制其他主要的肽聚糖连接反应(转糖基作用)。大多数细菌中都存在万古霉素的特异结合位点，即肽聚糖前体的 D-丙氨酸-D-丙氨酸末端。但是，万古霉素的分子量太大，超过了革兰阴性菌外膜上膜孔蛋白的排出限度，所以万古霉素不能到达革兰阴性菌的作用靶点。因此，万古霉素只对革兰阳性菌起作用。脑膜败血伊丽莎白菌是该规则的一个明显例外，这种异常特征通常可以用于诊断此菌[321]。

革兰阳性菌获得性万古霉素耐药有 3 种途径，很大程度上可以由它们所在的菌种进行分类：①肠球菌中变异的五肽前体末端为 D-乳酸或 D-丝氨酸而不是 D-丙氨酸；②葡萄球菌中发生细胞壁突变；③肺炎链球菌的耐受性。第一种耐药的重要性在于它的流行性、所涉及基因的可转移性和引起感染菌种的重要性，而其他两种类型的重要性更多地是由种属重要性而不是耐药流行性来定义。

到目前为止，已发现了 9 种通过改变万古霉素结合靶点导致肠球菌糖肽类耐药的变异体。4 种操纵子(*VanA*、*VanB*、*VanD*、*VanM*)编码以 D-乳酸为末端的前体，其余 5 种操纵子(*VanC*、*VanE*、*VanG*、*VanL*、*VanN*)编码以 D-丝氨酸为末端的前体[322-324]。其中，对于临床最重要的是 VanA 和 VanB。VanA 和 VanB 由相似的操纵子编码，操纵子上的 3 个基因(*vanH*、*vanA*、*vanX* 或 *vanHB*、*vanB*、*vanXB*)是表达耐药所必需的[51]。其他 2 个基因(*vanY*、*vanZ* 或 *vanYB*、*vanW*)有助于增强耐药性，但不是耐药表达所必需的[325-326]，另外还有 2 个基因(*vanS*、*vanR* 或 *vanSB*、*vanRB*)调节 3 个必需基因的转录[326-327]。这些基因的最终目的是改变五肽前体的结构，使其末端从 D-丙氨酸-D-丙氨酸变为 D-丙氨酸-D-乳酸，从而使万古霉素与其靶点结合的亲和力降低约 1000 倍。参考文献[328]概述了产生这种结构的反应序列。由于末端氨基酸在转肽反应中会从五肽上断裂，因此耐药菌株细胞壁的最终成分与不含耐药基因的菌株并无区别。显然，具有促进转肽作用的肠球菌 PBPs，在处理变异的前体时毫无问题。

VanA 型肠球菌对万古霉素和替考拉宁表型耐药，VanB 型菌株对万古霉素耐药，但似乎对替考拉宁敏感。这种敏感结果来源于替考拉宁不诱导耐药表达这一事实[327]。但是，一旦暴露于万古霉素后，VanB 操纵子表达，就会导致替考拉宁耐药。因此替考拉宁并不是治疗 VanB 型肠球菌感染的最佳选择，因为 VanB 调控区域的突变导致在治疗中容易出现替考拉宁诱导型或组成型表达的发生[329]。

VanA 和 VanB 操纵子都由转座子携带。VanA 仅位于转座子 Tn *1546* 上，Tn *1546* 是一个分子量为 10.4kb 的 Tn *3* 家族成员，可通过整合在接合质粒上在肠球菌中传播[326]。对不同菌株的比较可以发现，VanA 操纵子的基因序列高度保守，而不同临床菌株的 VanA 操纵子及 Tn *1546* 的限制性酶切图谱常显著不同[330]。这些差别来自于各种 IS 元件的插入，伴或不伴之后的部分可移动元件的缺失，某些研究者利用此差别建立特定临床背景下的菌株谱系。VanB 操纵子最常位于高度相似的转座子 Tn *5382* 或 Tn *1549* 上[37, 331]。这些转座子与肠球菌接合性转座子原型 Tn *916* 具有很高的同源性。与 *vanA* 基因不

同，已经发现 *vanB* 有 3 个等位基因变异体（*vanB*1、*vanB*2、*vanB*3）。*vanB*2 基因和 Tn *5382* 相关[332]。

临床上万古霉素耐药的肠球菌绝大部分是屎肠球菌，这种现象还无从解释[93]。绝大多数引起临床感染的万古霉素耐药屎肠球菌也对氨苄西林耐药，这是因为一组适应医院环境的克隆群（被称作克隆复合群 17，clonal complex 17）在全世界范围内出现。克隆复合群 17 菌株在世界各地都有发现，其特征是对氨苄西林耐药且经常携带公认的毒力基因，如屎肠球菌的 *esp* 和 *hyl* 基因[333]。

尽管在体外能将 *VanA* 基因转入金黄色葡萄球菌[334]，并且至少有 14 例关于患者标本培养出表达 VanA 的金黄色葡萄球菌的病例报道[335-337]，万古霉素耐药的金黄色葡萄球菌仍是极其罕见的[334-337]。在所有的报道中，均为 VanA 操纵子导致了耐药。在一个典型病例中，位于粪肠球菌广宿主谱质粒上的 Tn *1546* 似乎促进了耐药基因的转移，同时，一旦 Tn *1546* 进入葡萄球菌就会转位到葡萄球菌质粒上[338-339]。

VanC 操纵子是少数肠球菌属如铅黄肠球菌（包括以前生物型分类中的黄色肠球菌）和鹑鸡肠球菌的菌体细胞壁合成结构中所固有的[340-341]。VanC 菌株的五肽前体末端是 D-丙氨酸-D-丝氨酸，使其与万古霉素的亲和力降低约 7 倍，导致低水平耐药，万古霉素 MIC 值为 2～32 μg/ml。由 VanE、VanG、VanL 和 VanN 编码的细胞壁前体末端也是 D-丙氨酸-D-丝氨酸，促进低水平糖肽类耐药[342]。2011 年和 2012 年，两株万古霉素非敏感（MIC 值为 4 μg/ml）的无乳链球菌分别从美国（纽约和新墨西哥州）的 2 例患者中分离出来[343]，这 2 株菌没有流行相关性且均携带 VanG 元件。PCR 分析提示 2 株菌均为粪肠球菌 *VanG* 基因阳性[258]，但只有纽约菌株具有与粪肠球菌完全同源的 *van*G 序列[336]。一株于 2012 年分离自长期护理机构中患者尿标本的咽峡炎链球菌（*Streptococcus anginosus*），万古霉素 MIC 值为 4 μg/ml，这株菌携带的 VanG 元件与纽约分离到的万古霉素非敏感无乳链球菌几乎完全相同[344]。

被修饰的屎肠球菌 VanD 的五肽前体末端为 D-丙氨酸-D-乳酸，这些菌株表现为中等水平的糖肽类耐药（万古霉素 MIC 值为 64～128 μg/ml）。屎肠球菌 BM4339 中 VanX 等价酶在肠球菌中似乎无效的事实可以在一定程度上解释为什么没有观察到 VanD 的传播。BM4339 表现为耐药是由于其缺乏功能性细胞连接基因 *ddl*，而不需要 VanX 的活性来表达耐药[345]。除了 Van 系统，对万古霉素敏感性的下降还归因于双组分信号系统 CroRS，它对粪肠球菌中的抗菌药物介导的细胞壁压力有反应[346]。

在金黄色葡萄球菌中，糖肽类中等程度耐药[万古霉素中介金黄色葡萄球菌（VISA）和糖肽类中介的金黄色葡萄球菌]比完全耐药更常见。使用 CLSI 微量肉汤稀释法检测万古霉素 MIC 值，人异质性 VISA（hVISA）菌株表现为万古霉素敏感，MIC 值≤2 μg/ml[347]。然而在这些培养物中，有一小部分细菌是对万古霉素中等耐药的，这需要特殊的技术，即菌群曲线下面积法来进行准确的检测。具有 hVISA 和 VISA 表型的菌株细胞壁增厚，可能通过提供过量的假糖肽类结合靶点降低糖肽类敏感性[311]。在很多情况下，细菌转变为 hVISA 或 VISA 表型与 *vraSR* 双组分调节回路有关，在金黄色葡萄球菌中，细胞壁损伤激活 *vraSR*，并且调节 40 多个基因，这些基因中的一部分与肽聚糖的生物合成相关[347]。最近的研究也提示 *rpoB*、*graS*、*walK* 和 *walR* 在 VISA 产生中很重要[348-349]。有趣的是，与暴露于糖肽类抗菌药物效果相同，hVISA 表型也可以通过暴露于 β-内酰胺类抗菌药物筛选出来[350]。动物实验表明 hVISA 菌株的耐药水平可以降低万古霉素治疗[351]。

糖肽类耐药在凝固酶阴性葡萄球菌中也有报道。与金黄色葡萄球菌不同，溶血葡萄球菌的耐药与肽聚糖交联的成分改变有关[352]。但其导致万古霉素耐药的机制还不完全清楚。

通常，万古霉素的杀菌能力比 β-内酰胺类抗菌药物弱。在几个菌种中都能找到此重要现象的证据。例如，治疗金黄色葡萄球菌心内膜炎相关性菌血症时，万古霉素清除细菌的时间大约是 β-内酰胺类抗生素苯唑西林的 2 倍[353]。临床数据也表明，治疗甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌引起的菌血症时，与萘夫西林相比，万古霉素的治疗失败率和复发率更高[354]。万古霉素对一些 MRSA 菌株的疗效似乎特别差。在一项临床试验中，万古霉素只成功治愈了 9 例左侧心内膜炎患者中的 2 例[309]。1990 年首次报道了肺炎链球菌的万

古霉素耐药[355]。肺炎链球菌是导致大多数细菌性脑膜炎患者最常见的病原菌，杀菌性抗菌药物是细菌性脑膜炎的最佳治疗方法。至少已有一例关于万古霉素耐受的肺炎球菌性脑膜炎在治疗后出现预料中的复发的报道[356]。耐受性的出现与编码ABC转运子的操纵子(*vex 123*)突变有关，但是这种现象出现的机制尚未阐明[357]。深入的研究对于理解肺炎球菌耐受性对临床感染治疗的重要性是十分必要的。

(三)脂糖肽类耐药(lipoglycopeptide resistance)

特拉万星(telavancin)、达巴万星(dalbavancin)和奥利万星(oritavancin)分别是万古霉素、替考拉宁和氯霉素的半合成脂肽衍生物[358-360]。据报道，特拉万星具有双重作用机制：抑制细胞壁合成和破坏细胞膜功能[358]。与万古霉素相似，特拉万星具有一个糖肽核，它以高亲和力与肽聚糖前体脂质Ⅱ的末端酰基-D-丙氨酰-D-丙氨酸(D-Ala-D-Ala)结合[361]。另外，特拉万星与细菌细胞膜成分结合，导致膜去极化并增加膜通透性[362]。至于糖肽类，在不常分离的革兰阳性病原体[如片球菌属(*Pediococcus* spp.)和明串珠菌属(*Leuconostoc* spp.)]中发现了对特拉万星的固有耐药，因为掺入其细胞壁的肽聚糖链包括以D-丙氨酸-D-乳酸(D-Ala-D-Lac)代替D-Ala-D-Ala的肽聚糖C末端前体[363]。

在带有*vanA*操纵子的肠球菌分离株中具有对特拉万星和达巴万星的耐药性；但是，带有*vanB*的肠球菌仍然对2种脂肽类都敏感[364-365]。像万古霉素和替考拉宁一样，特拉万星也可以在产生VanA的菌株中有效诱导VanX活性(D-Ala-D-Ala二肽酶)，在表达VanB的菌株中则不能。表达VanA的罕见金黄色葡萄球菌菌株的特拉万星MICs升高，但不如万古霉素高[366]。奥利万星也与脂质Ⅱ结合，但它具有第二个独特的肽聚糖结合区，可与金黄色葡萄球菌和肠球菌的末端D-Ala-D-Ala(或D-乳酸盐)附近的肽相互作用，但与之不同，允许奥利万星对因产生D-Ala-D-Lac而对万古霉素耐药的菌株的修饰肽聚糖肽类末端保持结合亲和力[367-368]。

VISA菌株具有稍高的特拉万星MIC，推测细胞壁增厚会降低特拉万星与肽聚糖的相互作用及其进入细胞膜的作用[369]。用特拉万星筛选体外突变株，全局调控子被破坏导致其表型与VISA相似[370]。

(四)恶唑烷酮类耐药(oxazolidinone resistance)

恶唑烷酮类的耐药并不常见，在2个大型监测系统中，不到2%的革兰阳性菌对恶唑烷酮类药物利奈唑胺耐药[371]。恶唑烷酮的靶标23S rRNA的改变最初是在大多数革兰阳性菌中观察到的主要耐药机制，显示出对该类抗菌药物的敏感性降低[372]。恶唑烷酮耐药发生率低可能是由于23S rRNA等位基因的数量(4～6个拷贝)，因为耐药的发生需要几个等位基因的改变。此外，降低的利奈唑胺敏感性水平与突变的等位基因数量有关[373]。G2576T替代是葡萄球菌和肠球菌临床分离株中最常见的23S rRNA改变[371]。有趣的是，23S rRNA的改变引起很高的细菌适应性代价，当某些等位基因突变时一旦没有选择压力，菌株可恢复为野生型和敏感表型[374]。

L3和L4核糖体蛋白的突变也会导致细菌对恶唑烷酮类的敏感性降低[375]。L3蛋白的127和174位氨基酸，以及L4蛋白的65和72位氨基酸观察到了这些突变[371]。L3突变介导截短侧耳素类抗菌药物[泰妙菌素(tiamulin)、沃尼妙林(valnemulin)和瑞他帕林(retapamulin)]的交叉耐药，这种类型的抗菌药物在人类和兽医中被局部使用。L3和L4改变通常在凝固酶阴性葡萄球菌属的临床分离株中检测到，表现出对恶唑烷酮类的耐药，通常具有多种耐药机制，包括*cfr*或23S rRNA的改变[376]。

*cfr*基因是第一个恶唑烷酮获得性耐药的机制，它使针对革兰阳性菌的五类主要抗菌药物失效，该基因编码一种称为$PhLOPS_A$的耐药表型，可介导对苯酚(Ph)、林可酰胺类(L)、恶唑烷酮类(O)，截短测耳素(P)和链霉菌素A(SA)的耐药[377]。*Cfr*催化23S rRNA中A2503残基的C-8原子的转录后甲基化，该耐药基因已在全球多种细菌中检测到[378]。在屎肠球菌和艰难梭菌的分离株中检测到一个名为*cfr*(*B*)的*cfr*变异体[379-380]。该基因介导的耐药性与*cfr*相似，并且和在几种细菌中推定的氯霉素和(或)氟苯尼考耐药蛋白的序列具有同源性。

另一个质粒携带的耐药基因 *optrA* 导致苯酚和恶唑烷酮类耐药[381]。该基因编码一个 ABC 转运蛋白家族外排系统，主要存在于粪肠球菌的临床分离株中，似乎是该物种中普遍存在的恶唑烷酮类的耐药机制。获得性的基因 *cfr* 和 *optrA* 似乎已经在细菌中循环了很长时间，并且可能通过使用其他抗菌药物被共选择。此外，已经表明恶唑烷酮类 MIC 升高的革兰阳性菌可能具有多种耐药机制[382]。

(五)大环内酯和酮内酯类耐药(macrolide and ketolide resistance)

临床实践中常见的几种大环内酯类抗菌药物包括红霉素、克拉霉素和阿奇霉素。大环内酯类通过与 50S 核糖体亚基的肽基-tRNA 结合区可逆结合而抑制敏感菌株中的蛋白质合成，抑制新合成的肽基-tRNA 分子从核糖体上的受体位点转移至肽基(或供体位点)。红霉素不与哺乳动物核糖体结合。大多数革兰阴性菌对红霉素耐药，因为红霉素进入细胞内受到限制。

对大环内酯类抗菌药物产生耐药的机制有几种，其中最主要的是核糖体的甲基化，阻止了红霉素和其他抗菌药物与其结合[46]。核糖体甲基化是由 *erm*(红霉素核糖体甲基化酶)介导，这些基因存在许多变异体，包括 *erm*(A)、*erm*(B)、*erm*(AM)和 *erm*(TR)[383]。甲基化的核糖体介导对大环内酯类、林可酰胺类(克林霉素和林可霉素)、链霉菌素 B 和酮内酯类的耐药，从而产生了名为 MLS_BK(以前称为 MLS_B)的表型特征。其耐药性通常由大环内酯类抗菌药物而非克林霉素诱导($iMLS_BK$)。在某些菌株中，*erm* 型耐药是组成性表达($cMLS_BK$)，也可导致对克林霉素的耐药。

作为大环内酯类化合物靶标的 23S 新生肽链延伸区域中的突变也使菌株具有组成性 MLS_BK 表型。这些突变通常位于 2038 至 2098 位，但它们可以包含直至 2611 位的核苷酸。这种耐药机制在革兰阳性菌中并不十分常见，在<2%分离株中观察到[383]。

大环内酯类耐药的另一个重要机制是由 MFS 成员 *mef* 基因编码的外排泵表达(类似于流感嗜血杆菌和大肠埃希菌中的 AcrAB-TolC)[384]。这些外排泵介导对大环内酯类抗生素的耐药，但对克林霉素不具有耐药性，称为 M 表型。*mef* 基因包括两个主要类别，肺炎链球菌中的 *mef*(E)和化脓链球菌中的 *mef*(A)。多种革兰阳性菌中存在相似的基因。其他大环内酯类耐药机制包括 L4 和 L22 核糖体蛋白的改变，Rlm 甲基转移酶，水解大环内酯类的酯酶和 Mrs 外排系统[383]。

酮内酯类属于一类新的半合成的 14 元环大环内酯类化合物，它与红霉素的区别在于它具有 3-酮基而不是中性糖 L-cladinose。酮内酯类与细菌核糖体上的另一个位点结合，相对于其他大环内酯类化合物而言，它们的结合亲和力更高[385]。泰利霉素(telithromycin)(一种酮内酯类抗生素)对肺炎链球菌[无论其对红霉素和(或)青霉素是否耐药]，红霉素敏感的化脓性链球菌和红霉素耐药的化脓性链球菌 M，$iMLS_B$ 或 $cMLS_B$ 表型[其中耐药是由 *erm*(TR)基因编码的甲基化酶介导的]均具有统一的高活性[386]。酮内酯类对具有 $cMLS_B$ 表型或 $iMLS_A$ 亚型[耐药由 *erm*(B)基因编码的甲基化酶介导]的红霉素耐药化脓性链球菌的活性较低；这些菌株的表型范围从敏感的上限到耐药[387]。泰利霉素耐药的肺炎链球菌临床分离株含有前导序列中 136bp 缺失而改变的 *erm*(B)[388]。通常表达 $cMLS_B$ 表型的甲氧西林耐药葡萄球菌对泰利霉素不敏感[385]。

(六)奎奴普丁-达福普汀耐药(quinupristin-dalfopristin resistance)

奎奴普丁-达福普汀是半合成链霉菌素 A(达福普汀)和 B(奎奴普丁)的混合物，保留了对链霉菌素 B 耐药菌株的活性。对链霉菌素 A 的耐药性是由 *vgaA*、*vgaB* 和 *vgaAv* 编码的 ATP 结合外排系统或由使该分子失活的 *vatA*、*vatB*、*vatC*、*vatD* 或 *vatE* 编码的乙酰基转移酶引起[389]。编码链霉菌素 A 耐药性的基因介导该药物的耐药。链霉菌素 A 的耐药首先发现于携带 *vgaA* 的金黄色葡萄球菌，随后，在同一物种中也检测到 *vatA*[390-391]。*vgaB*、*vgaAv*、*vatB* 和 *vatc* 基因的变异体在葡萄球菌中也有报道。在这些物种中检测到包括一个或多个基因重复的 *vga-vat* 基因的组合[390]。此外，L22(*rplV*)核糖体区域的突变会引起金黄色葡萄球菌对奎奴普丁-达福普汀的抗药性[392]。

在肠球菌属中，*vatD*(先前为 *satA*)、*vatE*(先

前为 *satG*)，以及偶尔存在 *vatA* 被认为与链霉菌素 A 的耐药有关[393]。在大多数情况下，*vatD* 和 *vatE* 和一个 *erm* 基因共存，提示对链阳菌素 A 和 B 都耐药可能是介导屎肠球菌对奎奴普丁-达福普汀耐药达到临床显著水平所必需的[394]。rRNA 甲基化酶 Cfr(在上文的"恶唑烷酮类耐药"中已详细讨论)介导革兰阳性菌对链霉菌素 A 的耐药性[371]。

链霉菌素 B 的耐药与 *erm* 家族的 rRNA 甲基化酶裂解酶基因 *vgbA*、*vgbB* 或 ABC 外排系统家族的 ATP 结合蛋白有关。质粒携带的 *ermA*、*ermB*(*ermAM*)和 *ermC* 可以使核糖体甲基化，从而降低奎奴普丁和其他链霉菌素 B 的结合[395]。质粒携带的 2 个基因 *vgbA* 和 *vgbB* 编码一种链霉菌素失活酶(裂解酶)，主要在葡萄球菌中检测到[389]。葡萄球菌中的 *msrA* 和 *mrsB* 编码的 ATP 结合蛋白和肠球菌中的 *mrsC* 编码的 ATP 结合蛋白和排出链霉菌素 B，*lsa* 编码的 ABC 转运蛋白在粪肠球菌中赋予 LS_A 表型(对林可酰胺和链霉菌素 A 耐药)[396-397]。介导对链霉菌素 A 和 B 耐药的基因通常存在于可转移的质粒上。尽管奎奴普丁-达福普汀对大多数人类屎肠球菌均具有活性，但在动物饲料中使用维吉尼霉素(virginiamycin)(一种链霉菌素组合相关的抗生素)与从动物中分离得到的高比例耐药菌株相关[398]。在许多情况下，这些分离株中不存在已知的对奎奴普丁-达福普汀耐药机制，这表明在屎肠球菌中对奎奴普丁-达福普汀的耐药仍有许多未知待探索。

(七)夫西地酸耐药(fusidic acid resistance)

夫西地酸的耐药最初被认为主要是由 EF-G 编码基因(称为 *fusA*)上的自发突变引起的[399-400]。实验证明 *fusA* 中的突变可增加金黄色葡萄球菌夫西地酸的 MICs[401]。此外，定点突变表明 P406L、H457Y 和 L461K 突变将夫西地酸 MIC 升高了至少 32 倍[402]。在随后的发现中，获得性的夫西地酸耐药也归因于编码对 EF-G 具有保护作用的蛋白质的基因，包括 *fusB* 和 *fusC*[402]。携带 *fusB* 和 *fusC* 的分离株夫西地酸 MICs 通常在 4～32 μg/ml 范围内，低于携带 *fusA* 突变分离株的 MICs[403]。这些基因可以是染色体或质粒介导的，据报道 *fusB* 位于一种普遍存在的质粒 pUB101 中，该质粒携带对其他类抗菌药物的耐药基因，有助于对带有这些遗传结构的分离株进行共选择[400,404]。

最近报道了 *rplF* L6 部分的改变导致金黄色葡萄球菌小菌落变异体(SCV)中夫西地酸的不敏感性[405]。携带这些突变的菌株的 MIC 为 4～32 μg/ml，表明夫西地酸可能在该核糖体区域中具有二级作用位点，称为 *fusE*[405]。其他耐药机制，例如，通透性改变和Ⅰ类 CAT 引起的酶促失活也与没有其他耐药基因被证实的葡萄球菌属和肠杆菌科一些分离株的夫西地酸耐药有关[400]。此外，*fusD* 基因与腐生葡萄球菌对夫西地酸固有耐药有关[406]。

(八)莫匹罗星耐药(mupirocin resistance)

莫匹罗星是一种局部抗菌剂，可用于治疗皮肤和软组织感染，如化脓链球菌或金黄色葡萄球菌引起的脓疱病或继发伤口感染。此药也越来越多用于外科手术前鼻腔携带金黄色葡萄球菌患者的去定植，以减少随后的感染[407]。耐药的发生率在不同的地区有所不同[408]。金黄色葡萄球菌对莫匹罗星的耐药机制包括编码异亮氨酰-tRNA 合成酶的天然基因(称为 *ileS*)的突变，这是莫匹罗星的靶标，以及外源不易被莫匹罗星抑制的异亮氨酰-tRNA 合成酶基因的获取[409]。*ileS* 中的突变导致低水平的耐药，莫匹罗星 MIC 范围为 8～64 μg/ml。获得性的莫匹罗星耐药介导高水平的耐药，MIC 值≥512 μg/ml，通常由 *mupA* 编码[409]。*mupA* 基因(也称为 *ileS2*)编码具有异亮氨酰 tRNA 合成酶结构基序的蛋白质，并携带在多种接合质粒上，基因的侧翼是插入序列 *IS257*，有助于其转移[409-410]。另外，携带 *mupA* 的质粒通常携带大环内酯类、四环素类和氯霉素的耐药基因，这些基因可通过使用这些其他药物促进对莫匹罗星耐药的选择。另一种基因 *mupB* 与 *mupA* 的同源性较低，可导致莫匹罗星的高水平耐药[411]。凝固酶阴性葡萄球菌被认为是金黄色葡萄球菌获得外源的异亮氨酰 tRNA 合成酶基因的贮藏库，某些分离株表现出低水平和高水平耐药的机制。低水平的莫匹罗星耐药的临床意义尚未得到很好的理解，但是去定植失败或不能维持持续去定植状态与高水平耐药相关[407]。

四、抗厌氧菌药物的耐药

甲硝唑耐药(metronidazole resistance)

甲硝唑是硝基咪唑类杀菌剂中的一员。5-硝基咪唑分子是一个药物前体，其活化依赖于无氧条件下硝基的还原。因此，其抑制谱主要包括厌氧菌，但也包括幽门螺杆菌和某些原生动物。在细菌中，甲硝唑的硝基接受一个来自电子传递蛋白(铁氧化还原蛋白)的单电子，产生一个有毒的阴离子自由基，导致 DNA 损伤和细胞死亡[412]。厌氧菌对甲硝唑的耐药很少见[413]。在某些情况下，摄取和(或)还原率的减少被认为是甲硝唑耐药的原因[414]。5 个拟杆菌基因：*nimA*～*nimE*，被认为和 5-硝基咪唑类抗菌药物耐药相关。关于 NimA 敏感和耐药的拟杆菌研究及最新的晶体结构分析提示，这种酶利用丙酮酸进行双电子反应生成一种胺，可以阻止有毒的阴离子自由基的形成[415-416]。*nim* 基因的表达具有多样性，这取决于提供活性启动子的 IS 元件插入位置的多样性[417]。在幽门螺杆菌中，*rdxA* 的点突变导致在微需氧环境中还原甲硝唑而产生耐药[418]。在阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)中，硫氧还蛋白还原酶可还原甲硝唑[419]。另外，硝化还原酶-1 的无义突变，硝基还原酶-2 的转录增加和 MATE(多药和有毒化合物外排)跨膜泵系统与蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia duodenalis*)对甲硝唑的耐药相关[420]。

五、结论

抗菌药物的发现、疫苗和卫生学理念的改进是迄今为止卫生保健相关科学领域的最大成就。不幸的是，数十年来在人类、畜牧业及农业领域抗菌药物的使用和滥用导致临床环境中耐药细菌的增加，侵蚀了现代医学所依赖的抗生素的有效性。如上所述，细菌耐药是复杂和多因素的。临床微生物学实验室在耐药发生时能够进行检测，并加以识别至关重要。

参考文献请扫二维码查阅

第 72 章　抗菌药物敏感性试验方法：总论

JOHN D. TURNIDGE, JAMES H. JORGENSEN

（胡继红　译；俞云松　审校）

临床微生物学实验室的主要功能之一是对有意义的细菌分离株进行抗菌药物敏感性检测。从医生的实用观点出发，通常认为敏感性试验结果是重要的，甚至比病原体的鉴定更为重要，尤其是在抗菌药物耐药性不断增加、医生选择治疗用药时只能使用毒性更高、更新、更昂贵的抗菌药物的年代。因此，实验室必须高度重视以下两方面：不但要提供快速、技术准确的数据，而且要以容易解读的方式向医生报告数据。敏感性试验的主要目的在于预测所检抗菌药物的治疗结果。通常按敏感性分类（categories of susceptibility）报告结果[1]。某种抗菌药物结果为"敏感（susceptible）"，提示以适当剂量用药时，患者对治疗有反应的可能性很大。"剂量依赖敏感（susceptible—dose dependent）"提示加大药物的剂量或给药频率，或变更输液时间，可能实现对受试菌给予适当的药物治疗[1]。而"耐药（resistant）"结果提示采用这种抗菌药物治疗时因药物暴露不足可能导致失败。

多数药敏试验方法的敏感性分类中还包括了"中介（intermediate）"，"中介"有几种含义[1-4]。对于那些给予较高剂量仍很安全的药物（如青霉素类、头孢菌素类）而言，此分类提示可能需要更高剂量以确保疗效，或当该药物在感染患者的体液（如尿）中浓度较高时，可能证明该药仍有效。反之，对于存在炎症而药物很难达到的身体部位（如脑脊液），使用该抗菌药物应特别谨慎。"中介"也表示一个检测缓冲区，以防止将真正耐药的菌株错划为"敏感"，反之亦然。

敏感性试验的另一个目的，是指导医生针对某种特殊的临床问题选择最适的抗菌药物。在多数临床机构，患者通常接受 24～48 h 甚至更长时间的经验治疗后，医生才能获得敏感性试验结果。敏感性试验结果可能确证了该病原微生物对起始的经验用抗菌药物是敏感，或可能是耐药，并为耐药患者提供替代治疗（alternative therapy）方案。只要有可能，药敏试验报告应给医生提供敏感的替代抗菌药物。如果患者对初始抗菌药物出现不良反应，这些替代药物的结果则有用处。专业学会、保健组织和机构在抗生素管理项目中越来越强调，应用药敏试验结果指导靶向治疗，选择病原体可能敏感的最窄谱、最便宜的药物。这对于住院患者尤为实际，因为在他们中间抗菌药物的耐药率更高，并且住院患者比门诊患者更容易改变治疗方案。为达到疗效，此时药敏试验的准确性显得更为关键。

近年来，在快速检测细菌重要的耐药机制（resistance mechanisms）方面已经取得进展，包括血培养获得菌株，用分子检测方法（molecular test methods）（如 PCR 或微阵列技术 microarray techniques）1～2 h 即可出结果；Cepheid GeneXpert[5]，BD GeneOhm[5]，Biofire Film Array[6,7] 和 Luminex Verigene[8]。这些试验可检测引起金黄色葡萄球菌对苯唑西林耐药的最常见机制（*mecA*）和肠球菌对万古霉素耐药（*vanA* 和 *vanB*）。一些引起革兰阴性细菌重要耐药的 β-内酰胺酶（beta-lactamases）（如超广谱 β-内酰胺酶和碳青霉烯酶）可用这些方法检测（Biofire 和 Verigene）。这些结果可警示医生勿将这些药物用于可能威胁生命的感染，引导医生选择其他可能适合的经验性治疗药物，不受检测到的耐药机制的影响。有个公司还开发了其他方法，即快速检测血培养分离株的表型敏感性试验（phenotypic susceptibility testing），采用先进成像和改良生长技术（accelerate pheno system）[9]，药敏结果可在 3～6 h 完成，不仅能提示微生物对某些抗菌药物

耐药，还可报告抗菌药物对某个微生物敏感。这些经短时间培养后的血培养肉汤沉淀物，直接接种至药敏检测仪（如 BD 凤凰仪和生物梅里埃 Vitek2），以有限的基础工作完成了过去相当耗费体力的操作，这个方法可在 4～16 h 报告药敏结果[10-11]。

临床微生物学实验室应该仅在下列情况下进行常规的敏感试验：针对该病原已有良好的标准化（well-standardized methods）药敏试验方法，而且其耐药性已被公认或怀疑是临床问题。不应对正常菌群（normal microbiota）或定植菌（colonizing organisms）做药敏试验。目前，针对常见的需氧菌和兼性厌氧菌与全身性用抗菌药物，常规的敏感试验方法已经得到了很好的标准化。而对一些不常见或高度苛养的细菌和多数局部用抗菌药物，简易的常规试验方法尚未标准化。基于此局限性，临床和实验室标准化研究院（Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI）针对一些厌氧菌[12]、不常见或苛养细菌如何做药敏试验和结果解释已发布推荐指南[13]。对某些致病菌[如结核分枝杆菌和侵袭性真菌（invasive fungi）]，常规试验对于患者处置很重要，然而此类检测最好在专业的实验室进行，这些实验室因检测数量多而保持技术熟练度比较高，并且有可能识别出不常见或不准确的结果。对于其他特殊病原体（如支原体、衣原体、军团菌、螺旋体、病毒、原虫和蠕虫）的药敏试验方法现阶段尚未建立，仅限于在少数专业实验室内开展。从常规测试的方法学和药物选择角度看，药敏试验有各种选择。

一、药敏试验方法的选择

临床微生物学实验室可从几个传统或新型方法中选择常规药敏试验。这些方法包括肉汤微量稀释法、纸片扩散法、抗菌药物浓度梯度法和自动仪器法。近年来，商品化的肉汤微量稀释法和自动化仪器法替代纸片扩散法已成为一种趋势。然而，由于纸片扩散法可自主灵活地选择药物、引入新药或改变折点后反应迅速、成本低，仍受到持续关注。由于可供使用的抗菌药物数量增加、不同医疗机构抗菌药物处方差别大，我们很难要求商品化检测系统的生产商提供标准的检测板以满足所有用户的需求。因此，纸片扩散法因其选药的内在灵活性，其价值不可否认。在所有药敏试验中，该方法是已建立的最为完善和验证最为充分的方法之一。CLSI[1] 和欧洲抗菌药物敏感试验委员会（European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing，EUCAST）[14] 周期性地（通常每年）对该方法进行更新和持续升级。现在，已有可读取结果、解释抑菌圈直径并存储信息的仪器，此仪器可减少试验人员间读取结果的误差[15-18]。

微量稀释法和琼脂梯度扩散法的优势包括：出具定量结果（如 MIC 值）而不仅仅是分类结果；具有准确检测那些无法用纸片扩散法检测的某些厌氧菌和苛养菌；另外，还得益于与微量稀释和自动化系统相配套的计算机系统的辅助[19]。事实上，对那些实验室信息系统存在局限性或缺乏灵活性的实验室，计算机化管理系统非常重要。在解释特定药物对少数细菌的活性方面，给出 MIC 值非常必要（如青霉素和头孢菌素对肺炎链球菌、万古霉素对葡萄球菌）[1-2]。然而，不能仅基于"常规 MIC 法对医生更有用"这种认识来选择 MIC 方法[19]。在选择适当的抗菌药物治疗大多数感染时，目前尚无明确证据表明 MIC 比敏感性分类结果相关性更强[20]，虽然有文献建议将 MIC 结果整合到一个更为详细并以患者为中心的报告中[21]。

为了给菌血症患者比常规的基于培养方法的更快的药敏结果，实验室应选用快速检测耐药机制的分子生物学方法（Biofire、GeneOhm、GeneXpert、Verigene）或快速表型检测（Accelerate Pheno，或 Phoenix Vitek 2）。比传统的基于生长的方法早一天或几天提供药敏结果，在患者管理上似乎是一个进步，特别是对于菌血症病例[5-11,22]。而将更快速（同一天）的基质辅助激光解吸离子飞行质谱 鉴定病原菌技术引入常规实验室，促进了对更快速敏感试验的需求[23-25]。还包括全基因组测序技术可检测难鉴定或可影响抗菌药物治疗的不常见耐药[26-27]。一些研究显示，快速药敏试验方法的应用给临床和经济带来了益处[25,28-32]，而早期研究未显示这种益处[33]。当然，如果实验室不采取更积极的沟通方式使医生知晓结果，即使是快速的药敏试验结果也不会产生实质性的影响[23,34]。

二、选择抗菌药物进行常规试验

实验室有责任检测和报告那些最适合的抗菌药物，“最适性”体现在这些药物应与分离株、感染部位及实验室所提供服务的医疗机构相匹配。实验室常规检测并报告的一系列抗菌药物，依赖于所在医疗机构的患者特征和遇到高度耐药菌株的可能性。三级医疗中心可为免疫抑制患者提供特别诊疗服务，其实验室比以初级保健门诊为主的实验室更需要常规检测广谱药物，而初级保健门诊对抗菌药物耐药的菌株较少。

实验室确定常规药敏试验的系列药物时，应遵循以下几个原则。第一，检测的抗菌药物应被纳入到医疗机构药品目录中，并且是医生日常开的处方药。第二，检测的菌种对受试药物选择的影响很大。CLSI 发布的表格列出了各组适合需氧菌和苛养菌检测的抗菌药物[1,13]。指南提供了对于每组细菌最适合检测的药物和基于标本来源（如脑脊液、血、尿）的治疗药物。表格还包括少量用于检测的替代用药，这些药物与其类似的药物相比，对耐药株具有更强的检测能力（如使用头孢西丁纸片预测葡萄球菌对 β-内酰胺类的耐药性[1]）。这个初始药物表格需要针对每个医疗机构的特殊需要进行调整，而这需要与以下人员讨论来确定，包括感染科医生、药师、感染控制委员和机构的药物处方委员[1]。

制定常规检测系列的第三个重要步骤是确认实验室可获得常规检测用的所有药物。一些方法（例如，纸片扩散法、梯度扩散法、实验室自制肉汤和琼脂稀释法），在选择试验药物时具有最大程度的灵活性。而一些商品化系统的灵活性相对较低，或可能延迟增加最新批准的临床用药。然而，对某个分离菌株而言，任何一种药敏方法能同时检测药物种类的最多数量均会受到实际情况的限制。

三、建立敏感性折点（susceptibility breakpoints）

已达成共识的是，MIC 值是实验室检测抗菌药物对微生物活性最基本的测量值。其定义为在与微生物生长速率相关的规定时间间隔内（通常为 18～24 h），抗菌药物抑制待测微生物的最低药物浓度。MIC 是基本测量值，此值形成了多数敏感试验方法的基础。将之与药物在体液内达到的浓度相比较，可确定药敏的折点。

传统检测 MIC 的技术是将菌株加入一系列含 2 倍稀释抗菌药物的适宜培养体系（如肉汤或琼脂）中。起初，使用 2 倍稀释方案是因为在肉汤法中，从某一个起始浓度制备稀释液时操作简便。随后发现，无耐药机制的某种细菌对某药物 MIC 的对数值呈统计学正态分布，从而证明此系统是有意义的。这为研究者提供了检测细菌群体 MIC 值分布的机会，并且与菌株的正常 MIC 值相比较，如野生型，鉴别菌株是否 MICs 异常增高（高于流行病学 cutoff 值[35]），（http://mic.eucast.org/Eucast2/）。

体外 MIC 值的检测受大量因素的影响，包括培养基成分、接种量、孵育时间、菌株存在的耐药亚群等。这些体外检测条件并不涵盖影响体内抗菌活性的其他因素，这些因素包括亚 MIC 效应（sub-MIC effects）、抗生素后效应（postantibiotic effects）、与蛋白质的结合、菌株致病性或产毒素的影响、感染部位氧化还原电势的变化、随着时间变化血液和感染部位不同药物浓度水平而导致的药代动力学改变。然而，标准条件下测定的 MICs 值仍提供了建立药效学靶值的一个固定参考点，而这个靶值具有预测体内疗效的能力。药理学的靶值可直接应用于产生 MIC 的常规稀释法，例如肉汤微量稀释法、琼脂稀释法、梯度法和一些自动仪器。MIC 还可提供产生纸片扩散法折点的参考值。

折点（或解释标准）是确定敏感、中介和耐药分类的值。建立分类值的方法因机构或标准化主体而异。依据使用的方法不同，有 4 种来源的数据可用于折点的建立[38]。

（一）MIC 分布

考察 MIC 分布可以提示特定药物对无任何已知耐药机制菌群（野生型群体）的 MIC 值范围。这些分布有助于识别新出现的耐药机制，其依据是 MIC 落在正常分布范围之外的菌株会凸显出来。然而，由于种间变化大，且对于一些 MIC 高出正常范围的菌株，MICs 可能低于临床推导的折

点，因此 MIC 的分布限制了其直接应用。近期有证据提示，这些菌株仍可能对治疗有反应——CLSI 和 EUCAST 均认同此观点，尽管此观点与一些耐药机制相矛盾[39]。

(二)药代动力学和药效学

药代动力学是检查某种药物在体内吸收、分布、累积和清除(代谢和排泄)。这些参数通常通过健康志愿者确定的。药物的 MICs 可以和药物在血液或体液(如脑脊液)中所能达到的浓度相比较。过去，折点通常是这样选择的，即敏感致病菌的 MIC 在多数或整个给药间隔均低于药物浓度水平。目前，当建立折点时应考虑更新的数据包括药效学评估。

药效学是研究药物对微生物作用的时间过程的学科。对于抗菌药物而言，预期活性是清除致病菌。体外药效学研究显示药物分为三类：第一类主要是无抗生素后效应或后效应很短的时间依赖型药物，第二类是具有长的抗生素后效应的时间依赖型药物，第三类是为显著的浓度依赖型药物[40]。对于时间依赖型且没有或有短暂抗生素后效应的药物，体内杀菌活性的关键决定值是在一个给药剂量间隔(dosing interval)内，药物浓度超出 MIC 值的时间百分率。对于其他两类药物，重要的决定性因素是药物浓度-时间曲线下面积与 MIC 值之比 和(或)峰值浓度与 MIC 的比值。对于 β-内酰胺类、短效大环内酯类和克林霉素，相关的检测值是药物浓度超过 MIC 值的时间百分率；对于氨基糖苷类、长效大环内酯类、四环素类、糖肽类及氟喹诺酮类，浓度-时间曲线下面积或峰浓度与 MIC 值之比是相关的参数[40-41]。这些值可用于计算标准剂量的药物达到最佳疗效的最大 MIC 或折点。

(三)临床和细菌学反应率

在临床试验过程中，对于已确定新药 MIC 值的菌株，其临床有效率和(或)细菌学清除率是根据 MIC 分布确定的折点、药物药代动力学/药效学特点相关性的显示。药敏试验判断为敏感的细菌，可以预期至少可达到 90%的反应率。当然对于不同的感染部位和类型，反应率可能低一些。在一些国家确定折点主要依据临床和细菌学反应率。CLSI 和 EUCAST 建立折点时，既评估临床及细菌学反应率，还综合了群体分布、药代动力学和药效学，以便使确定的折点达到体外试验结果与临床预后间的最好相关性[42-43]。

(四)纸片扩散法的抑菌圈直径分布

一旦确定了 MIC 折点，便可检测各类菌的大量菌株，通过获得的抑菌圈直径与相应的 MIC 值之间的散点分布图来确定纸片扩散法的折点(图 72-1)。过去采用线性回归方程的统计学方法，即用事先已确定的 MIC 折点计算相应抑菌圈直径的截距，现已不推荐此法。通常用于推导纸片扩散法折点常见并实用的方法是错误率分界法，即确定抑菌圈直径的判定标准是基于纸片法结果解释错误率的最小化，特别是极重大错误(very major errors)率的最小化[44-45](图 72-1)。正在研发的新的统计学方法以提高其与 MIC 值的相关性[46]。最新 CLSI 方法聚焦于：靠近推荐折点的结果解释错误率与高于折点一个 log2 稀释度的 MIC 的解释错误率的比率[42]。这一观念源于：人们对靠近折点的菌株检测 MIC 错误率的关注度不及对更耐药或更敏感菌株错误率的关注度。目前，统计学建模技术显示有近似或更好的效果[47]，并且已经在线上工具完成(https://dbets.shinyapps.io/dBETS/)。

由各国自己的专业团队或管理部门推出的折点通常十分相似，例如，CLSI 和美国 FDA 只有少数折点有所不同，2 个团队也都在审查这些不同。然而，同样的药物在不同国家或地区使用的折点可能有显著的差异。其原因可能是同样的药物在不同国家使用的剂量或用药间隔不同。此外，一些国家在评价抗菌药物敏感性时更趋保守，更强调检测到新出现的耐药，主要是通过关注检测菌群的敏感性分布来判断。技术因素，如接种物浓度、培养气体及试验所用培养基均可影响 MIC 和抑菌圈直径，因此在一些国家会有不同的解释分类。这些技术方面的差异在本书第 73 章有概述。一种非美国的方法均尽量避免使用"中介"这一药敏分类，他们认为这种结果对医生而言价值有限[48]。在敏感和耐药两个分类之间缺少一个缓冲项，可导致较高的分类差错率，除非把方法的变异考虑在内。

各种遵循国际标准化组织(International Organization for Standardization)参考方法而制定的

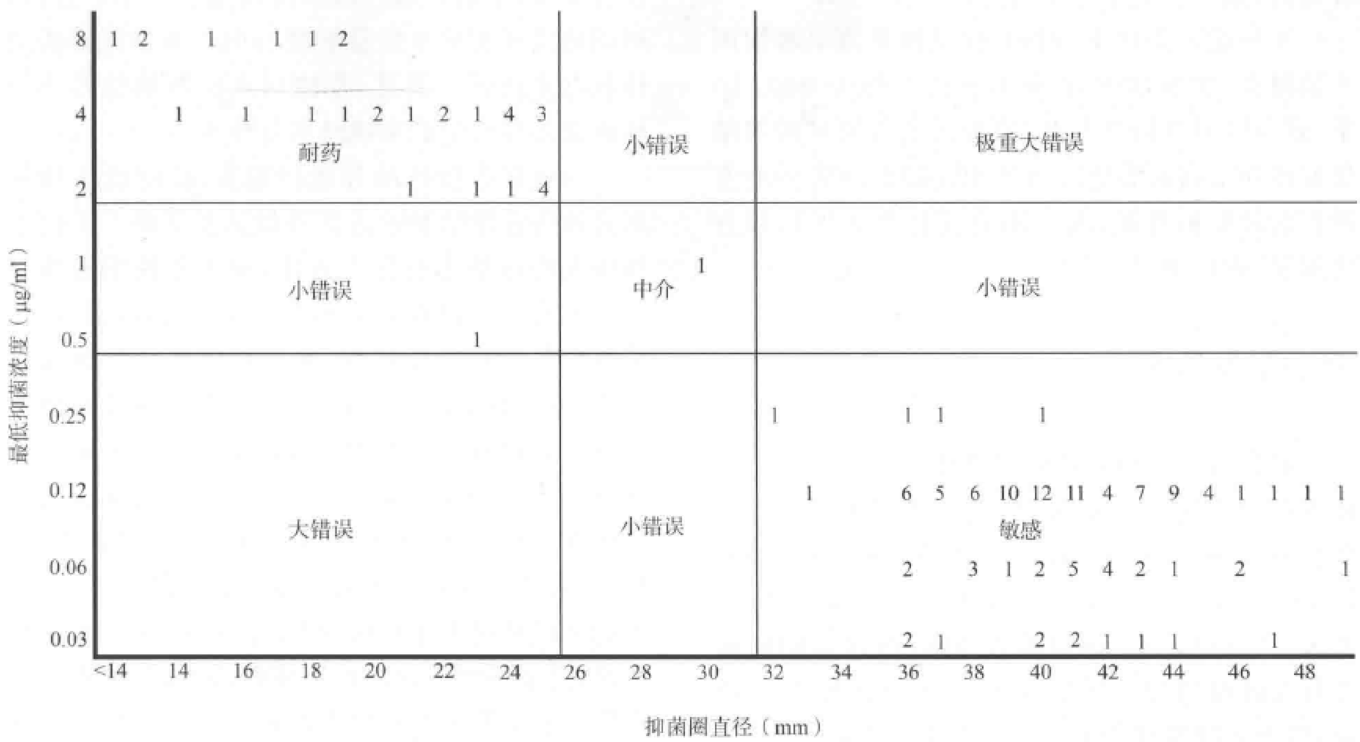


图 72-1　比较一个假设药物的抑菌圈直径与最低抑菌浓度(MIC)

国际药敏试验方法的相关信息和折点文件，均可从以下网址下载或购买。CLSI 网址：http://www.clsi.org；EUCAST 网址：http://www.eucast.org（目前 EUCAST 为其所有成员国设立或统一折点）。

四、耐药的分子检测

本书第 79 章将重点描述现有的一系列分子技术可检测许多耐药基因。目前这些技术尚未推荐用于常规检测，但在一些大型实验室确有用武之地。在这些实验室，可以用高性价比的方式检测一些重要的耐药基因。例如，葡萄球菌属特别是金黄色葡萄球菌的 *mecA* 检测、肠球菌属内的 *vanA* 和 *vanB* 基因检测。此外，分子技术正应用于快速检测血培养阳性瓶中甲氧西林耐药的金黄色葡萄球菌（*methicillin-resistant S. aureus*）。这些分子检测对于感染控制的价值正不断增加[49]。分子方法的价值还体现在确认异常耐药和检测具有流行病学意义的耐药机制。例如，目前人们对下列新出现和播散的肠道革兰阴性菌的耐药性具有很大兴趣——各种质粒介导的碳青霉烯类耐药（plasmid-mediated varieties of carbapenem resistance）[50]、质粒介导的喹诺酮类耐药（plasmid-mediated quinolone resistance）[51]和线粒体甲基化酶（ribosomal methylases）所致的氨基糖苷类耐药[52]，和检测 *mcr* 基因编码的对多黏菌素耐药。

五、确证试验和附加试验的选择使用

在做常规试验时，实验室可能会遇到分离株或出乎意料的试验结果；或者无适用的试验指南；亦或考虑具有重要的流行病学意义。CLSI 和 EUCAST 提供了一些指南，以提示哪些耐药可能属于意料之外的（即不常见或从未报道过）[1,54]。至于如何处理这些情况，指南推荐的方法不同，但是当结果不是由简单的实验室错误导致且可重复时，要用另一种备选方法检测，必要时应提交参考实验室。对于一些重要的耐药，如肠杆菌科细菌对碳青霉烯类的耐药，最有效的确认方法是检测耐药基因，详见本书第 79 章。在其他情况下，特殊表型检测详见本书第 75 章。

对少数抗菌药物-细菌组合而言，诱导性耐药（inducible resistance）被认为具有重要的临床价值。当前，只有葡萄球菌属和链球菌属对克林霉素诱导性耐药的检测方法是经过充分评估且已标

准化的，推荐实验室可常规使用[1]。

某些临床条件下，例如，肺炎链球菌引起细菌性脑膜炎，如果实验室常规方法不报告 MIC 结果，则可以通过检测 MIC 值来促进药敏试验的结果解释和指南的实施。可使用定制的或本实验室制作的微量稀释板，或选用商品化的梯度稀释方法测定 MIC 值[55]。

六、报告结果

报告结果是药敏试验关键性的最终步骤。发放报告虽无统一的要求，但应考虑以下要素。报告检测敏感(susceptible，S)、中介(intermediate，I)或耐药(resistant，R)的分类报告是标准做法，且为医生广泛接受。如果报告 MIC 数据应同时报告分类解释结果。敏感试验报告应依据如下规定：结果不能模棱两可，可打印或发放电子报告，特别是当报告超过一种细菌时。更为重要的是，推荐所谓分级报告(cascade reporting)，以减少临床医生不恰当地选择广谱抗菌药物(broader-spectrum antimicrobial agent)[21,56]。分级报告包括当分离株对窄谱药物敏感时，不发放广谱抗菌药物的结果。例如，当检测到金黄色葡萄球菌对苯唑西林或头孢西丁敏感时，则不报告万古霉素的结果。应考虑将这样的报告作为医院抗菌药物管理中最基本的部分[57-58]，正如实验室应在每年的总结报告中，对所有菌株的敏感性和耐药谱(抗生素谱)加以汇总一样[59]。

七、药敏试验未来的方向和需求

抗菌药物的耐药性正在具有临床意义的细菌中广泛传播[60]。因此，微生物实验室在管理患者的过程中扮演着重要角色，它为医生的治疗决策提供了准确的数据基础。而且，耐药监测的研究者、追踪和控制抗菌药物耐药菌传播的感染控制人员，也要使用药敏试验结果[60]。耐药监测可以在实验室、本地、地区、国家及国际各个水平进行，可以通过将实验室信息系统与中心数据库直接交换数据来进行。因此，存储结果的准确性几乎与检测和解释结果的准确性同等重要。

为迎接这些挑战和履行职责，临床微生物学家必须持续评估和改进其药敏试验策略。不论是传统方法还是新的分子方法，应优先使用准确且可靠的方法。由此，必须用已知特征的质控菌株认真监督试验操作过程，而这些菌株成为挑战检测方法能力的基础。现在，实验室必须针对特殊的微生物种或群来选用各种试验方法。不论是传统方法还是商品化方法，没有一种方法能成为检测所有抗菌药物、微生物和耐药机制的最佳方法。将来，需要加强对临床微生物学者的教育和培训。人们可以从基于计算机的“专家系统”中寻求一些帮助，此系统可以快而准地审核药敏谱，并识别潜在的异常结果或新的耐药机制[54]。分子方法正在取得快速的发展，并已在常规临床实验室的实际工作中启用(第 79 章)。

人们需要更有效的方式，以便将重要的药敏试验信息传达给医生，这要求在特定时间内及时发出报告，以使临床高效和有效地处置患者，且报告形式对各个专业的医生而言都应是清晰的。临床微生物学家在下述方面可以更加主动：报告药敏试验结果，并将其与其他数据库信息(如药物处方数据)进行交联，这样可以确保患者得到最有效的、符合成本-效益原则的治疗。

最后，随着更容易获得的分子技术的出现，特别是全基因组测序，开启了实验室诊断从表型药敏试验到基因型预测耐药重要转变的可能性[61]。在这一转变发生之前，需要更多的基因型和表型相关性的研究，并且总是需要可靠、可重复的表型检测去发现新出现的耐药。

参考文献请扫二维码查阅

第73章　抗菌药物敏感性试验方法：稀释法和纸片扩散法

LAURA M. KOETH，LINDA A. MILLER

（胡付品　译；张红梅、俞云松　审校）

抗菌药物敏感性试验（antimicrobial susceptibility tests，ASTs）用于评估抗菌药物在体外抑制或杀灭细菌的能力。药敏试验结果可用于支持抗菌治疗的决策、影响管理策略、评估处于研发阶段新抗菌药的活性及监测细菌耐药性的传播（第72章）。目前最常用的药敏试验方法分类如下：①稀释法测定最低抑菌浓度（minimum inhibitory concentration，MIC）结果；②纸片扩散法量取抑菌圈直径结果。一些全球性的科学机构包括国际标准化组织（International Organization for Standardization，ISO）、美国临床和实验室标准化协会（Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI）、欧洲抗菌药物敏感性试验委员会（European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing，EUCAST）均更新并发布用以执行稀释法和纸片扩散法药敏试验的详细参考标准[1-5]。参考方法的关键特性是可使实验室无须进行复杂的生产流程或机械化要求而开展实验，因为参考方法要求的基本试剂或耗材可从多渠道获得。ISO公布了肉汤微量稀释法的参考标准[5]；CLSI公布了肉汤宏量稀释法、肉汤微量稀释法、琼脂稀释法和纸片扩散法的参考标准[1-3]。EUCAST公布了纸片扩散法标准，并且建议实验室工作人员参考ISO标准进行肉汤微量稀释法药敏试验[4]。尽管ISO 20776-1和CLSI M07关于肉汤微量稀释法的标准存在细微差异，但是监管机构和科学文献证实两者本质上相同并且结果具有可比性[1,5]。

美国和许多发达国家的绝大多数临床微生物学实验室使用手工或自动化商业稀释和扩散产品，这些产品提供的AST结果证明符合标准参考方法。此外，众多新兴技术亦在研发用于药敏试验。各种商业化方法和新兴技术的描述和比较参考第72章。

各实验室所用药敏试验方法的选择基于多因素，如操作相对难易、成本、测试药物选择的灵活性、是否有自动化或半自动化设备方便测试，方法学认可的准确性[6]。参考稀释法主要用于制药企业建立新抗菌药物的MIC数据，研究机构和设备生产厂商作为标准评估新药敏试验方法，参考实验室用于确认不常见的敏感性试验结果。虽然参考稀释法已越来越少用，但一些临床微生物学实验室仍使用标准的参考稀释法用于常规诊断试验，包括自备肉汤微量稀释板或琼脂稀释平板。更常用的是，临床微生物学实验室使用商业化手工或自动化系统或MIC和纸片扩散法相结合的方法进行常规药敏试验。

本章所描述的方法主要用于测试常见分离的需氧或兼性厌氧菌，这些细菌在阳离子调节的Mueller-Hinton肉汤（cation-adjusted Mueller-Hinton broth，CAMHB）和无添加的Mueller-Hinton琼脂（Mueller-Hinton agar，MHA）中过夜培养后生长良好。测试苛养菌或不常见细菌的替代培养基和方法见第76章，以及CLSI M07和M100标准描述[1-3]。不常见分离菌或苛养菌的测试方法可参考CLSI M45文件[7]，CLSI M02和M07中未包含的不常见分离菌或苛养菌的测试方法可参考CLSI M45。厌氧菌测试方法见第77章、CLSI M100和CLSI M11[3,8]。CLSI苛养菌参考方法在帮助确认抗菌敏感性试验质量中发挥重要作用。未来，需要更多的国际化联盟开展苛养菌测试研究。

一旦通过肉汤微量、宏量或琼脂稀释法获得一个 MIC,或纸片扩散法获得一个抑菌圈直径后,解释标准,即众所周知的临床相关折点[如敏感(S)、剂量依赖敏感(SDD)、中介(I)、耐药(R)和非敏感(NS)],用于测试结果的分类(表 73-1)。简言之,临床相关折点首先通过肉汤或琼脂参考方法获得的 MIC 结果而建立。这些折点的建立基于:①流行病学界值(ECV 或 Ecoff),该界值适用于野生型细菌,这些细菌对该类药物的耐药机制的分布是明确的;②感染动物模型获得的药代动力学和药效学(PK/PD)数据,以及人 PK/PD 模型数据(非临床 PK/PD 界值);③临床预后研究数据,包括临床暴露-反应(clinical exposure-response,CER)相关性(临床界值和 CER 界值)[4,9]。其次,通过比较大量菌株的纸片扩散法抑菌圈直径和其 MIC 数据,并且选择能使 2 种标准参考方法之间的解释误差在可接受范围内的直径折点作为纸片扩散法抑菌圈直径折点(第 71 章)。

应根据药敏试验目的报告药敏试验结果。MIC 测试用于患者治疗时,通常应报告 MIC 值及解释分类(敏感、中介、剂量依赖敏感、非敏感),纸片扩散法仅报告解释分类。虽然绝大多数临床医生通常只使用解释分类用于治疗决策,但是提供确切的 MIC 值可以协助剂量调整或患者监测。如果药敏试验用于流行病学、抗菌药物管理或研究目的,应追踪 MIC 或抑菌圈直径数值的变化,作为耐药性发生的早期提示。新耐药机制可以从抗菌药物 MIC 高于 ECV 但仍处于该类药物临床敏感或中介分类的菌株中得到鉴定。其他考虑如药敏试验中药物的选择见第 71 章。

新药敏试验方法出现时,参考标准尤其是肉汤微量稀释法继续扮演关键角色,作为"金标准"评估新抗菌药物的活性、耐药监测和监管机构审批商业化药敏系统。但肉汤微量稀释法有其优缺点。CLSI/ISO 标准参考肉汤微量稀释法的优点包括:①实验室可操作的金标准,有助于确保结果在全球范围内的可比性;②历年 MIC 结果与临床预后和 PK/PD 间的关联数据。肉汤微量稀释法的缺点包括:①细菌生长试验中存在相关的固有生物学变异;②一种细菌的体外过程如生长和耐药基因的表达可能不能反映体内的同样过程,尤其是感染期间。

本章的目的是提供每一种标准参考方法的描述、背景、优点和缺点:肉汤微量稀释法、肉汤宏量稀释法、琼脂稀释法和纸片扩散法。

表 73-1 折点定义(CLSI 和 EUCAST)[3-4]

折点	CLSI	EUCAST
敏感(S)	指MIC 小于等于或抑菌圈直径大于等于敏感折点的细菌,通常可推荐治疗该感染部位所用抗菌药物剂量能达到的浓度抑制,获得可能的临床疗效	微生物敏感定义为对同级别抗菌药物活性与治疗成功存在高相关性
中介(I)	包括 MIC 或抑菌圈直径处于接近通常可达到的血液和组织水平的中介范围,其临床反应可能低于敏感菌株。注意:中介分类指可在药物生理浓缩的机体部位或当给予高于正常药物剂量时的临床疗效。该分类亦包括缓冲区,以防止小的、不受控制的技术因素而引起的重要解释差异,尤其是药物的窄谱药理毒性区	微生物中介定义为对同级别抗菌药物活性与治疗疗效间的相关性不确定。指该菌所致感染在机体生理部位浓缩的药物进行治疗或可采用药物高剂量。亦指缓冲区,以防止小的、不受控制的、技术因素而引起的重要解释差异。中介分类于 2017 年重新审阅;最新定义参考 EUCAST 网站
剂量依赖敏感(SDD)	指一株敏感的细菌取决于患者的给药剂量。敏感性试验结果(MIC 或抑菌圈直径)为 SDD 分类的菌株,为达到类似临床疗效的水平,与已建立的敏感折点相比,给药方案(如高剂量、多频次给药,或两者)必须保证更高药物暴露。应考虑最大的已证实的给药剂量,因为更高的暴露最可能足够覆盖一株 SDD 菌株。应考虑药品说明书上的推荐剂量及根据器官功能进行调整。注意:SDD 概念包括于抗菌药物的中介分类定义中。然而,一个中介结果的报告常常被临床医生和微生物学家所忽略或不被理解。当剂量高于那些以往按敏感折点计算的剂量被临床证实及足够的数据支持现有方案并已审阅时,指定为 SDD 分类。当使用中介分类时,其定义未改变	未使用

（续 表）

折点	CLSI	EUCAST
耐药(R)	指MIC大于等于或抑菌圈直径小于等于耐药折点的菌株，通常不被正常给药方案可达到的浓度所抑制和(或)证明MIC或抑菌圈直径落在特定的耐药机制范围内，研究显示针对该菌的药物治疗临床疗效不可靠	微生物耐药定义为对同级别抗菌药物活性与治疗失败存在高相关性
非敏感(NS)	该分类指因不存在或少见耐药菌株而只制定敏感折点。抗菌药物对菌株的MIC高于或抑菌圈直径低于供参考的敏感折点值时，报告非敏感。注意：①一株细菌判定为非敏感并不意味着一定存在耐药机制。在建立只有敏感折点时，在野生型分布亚群内可能存在MIC高于敏感折点但并不含耐药机制的菌株。②当描述一种微生物或具有SDD或中介和耐药分类解释的药物时，不应使用"非敏感"术语。分类为"中介"或"耐药"的菌株应称之为"不敏感"，而非"非敏感"	未使用

一、稀释法

肉汤和琼脂稀释法药敏试验常用于测定一种抗菌药物需要在体外抑制或杀灭微生物的MIC(以μg/ml或mg/L表示)。抗菌药物通常以log2(2倍)系列稀释测试，少数情况例外，抑制肉眼可见微生物生长的最低浓度定义为MIC。使用的药物浓度范围可随药物、受试微生物和感染部位(如脑膜炎时的脑脊液)而改变。测试范围应该覆盖定义折点的浓度并包含质控参考菌株预期涵盖的MIC值。

稀释法在某种意义上提供了操作的灵活性。标准培养基用于测试常见的微生物(如肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌、不动杆菌属、其他非发酵菌、其他非肠杆菌科细菌、葡萄球菌属和肠球菌属)，在补充添加物甚至用另一种培养基替代，可以更准确地测试纸片扩散法无法可靠检测的某些苛养菌(第76章和第77章)。ISO和CLSI[1,3,5,8]公布标准参考稀释法作为"金标准"用于评估目前自动化商业测试系统的敏感性和特异性(第74章)。

二、稀释法试验：肉汤法

肉汤法一般包括肉汤微量稀释法和肉汤宏量稀释法，前者96孔微量板中抗菌药物稀释液体积通常是每孔0.1 ml，后者每个含不同浓度抗菌药物的测试管中肉汤体积为≥1 ml(通常为2 ml)。

(一)肉汤微量稀释法

无菌圆形或圆锥形微量稀释板为稀释法敏感性试验提供了便利性，使肉汤微量稀释法得到广泛应用。事实上，肉汤微量稀释法现已视为药敏试验的国际参考方法(CLSI和ISO)[1,5]。含多种抗菌药物的一次性塑料板可同时对多种抗菌药物进行检测。虽然目前CLSI或ISO并未特别说明，但通常用于药敏试验测试的塑料多孔板应是聚苯乙烯、未经处理的微量板[1,5]。实验室可自行配制或购买商品化板条。标准参考方法包括新鲜制备板或冷冻板。许多商品化肉汤微量稀释板为冻干板。冻干板经厂商验证与新鲜板或冷冻板具有可比性。使用商品化冻干板时，应严格遵守制造商对板条储存、接种、孵育及结果判读的建议(第74章)。本节重点介绍实验室如何自行配制和使用肉汤微量稀释药敏板。不过，这里讨论的是与肉汤微量稀释法相关的大多数原理和操作，不考虑抗生素板的来源。

1. 抗菌药物的稀释 微量稀释法、宏量稀释法和琼脂稀释法抗菌药物储存液的制备流程相同。对于绝大多数抗菌药物，诊断级粉剂可从供应商处获得。对于新药，粉剂可直接从制药商获得。不同抗菌药物的溶解和稀释要求有差异，应考虑抗菌药物的溶解度或抗生素与板或移液系统塑料的结合问题。如达巴万星、特拉万星和奥利万星均要求在某些稀释过程添加吐温80，因为这些药物可固有地与塑料结合。准备绝大多数常用抗菌药物的初始储存液所需要的溶解剂和稀释剂列于CLSI M100和ISO 20776-1[1,3,5]。抗菌药物粉剂的分析说明应该引入效价，效价是配制标准

溶液所需粉末和稀释液质量计算公式的组成部分。

重量(mg)=体积(ml)×浓度(μg/ml)/效价(μg/mg)

体积(ml)=重量(mg)×效价(μg/mg)/浓度(μg/ml)

根据粉剂的纯度和水及盐含量分析数据的说明来计算效价。当制备初始储存液时，确认粉剂已溶于液体，肉眼观察未发现任何颗粒很重要。注意对于某些药物(CLSI M100 和 ISO 20776-1 文件可能有说明)，其可准确制备的最高浓度是有限制的[1,3,5]。

按照 CLSI M100 和 ISO 20776-1[1,3,5]描述的稀释方案，对初始储存母液进一步稀释。对那些不溶于水的药物，初始储存液要求以 DMSO 制备成中间浓度(终浓度的 100 倍)，以确保在所有 MIC 板孔中 DMSO 的水平低于 1%(参考 CLSI M100)[3]。

制备微量稀释板的自动化分配系统可对 10～200 ml 甚至更多含一种抗菌药物浓度的肉汤进行分装。从主管稀释开始，通过使用机械化分配仪连续将 0.05 或 0.1 ml 液体等量分装到肉汤微量稀释板的相应小孔中。如果分配的是 0.05 ml 体积时，当加入 0.05 ml 的接种物，则必须考虑到当加入 0.05 ml 的接种物时，最终药物浓度的 1:2稀释(参考“接种步骤”节)。当等量分配 0.1 ml 时，接种物体积通常足够小(≤0.01 ml)，因而无须对抗菌药物稀释方案进行调整。作为一般规则，当接种物体积不足孔内肉汤体积的 10%时，对抗菌药物浓度的稀释不必考虑[1]。

2. 药敏板的制备、补充及储存 常见非苛养菌的肉汤微量稀释法一般推荐使用阳离子调节 MH 肉汤(CAMHB)[1,5]。当检测铜绿假单胞菌对氨基糖苷类和其他细菌对四环素的药敏时，要求补充 Ca^{2+} (20～25 mg/L)和 Mg^{2+} (10.0～12.5 mg/L)以确保结果的可靠性[10]。然而，为保证操作可行性和结果一致性，CAMHB 被推荐用于所有菌株和抗菌药物的检测[1,5]。一些厂商提供的 MH 肉汤粉中已含一定浓度的二价阳离子，因此，应了解商品化水解培养基的阳离子含量，只有当商品化肉汤并未添加阳离子时才考虑补充。如果必须添加，可通过加入一定体积的无菌过滤冷冻的 $CaCl_2$ 储存液(3.68 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 溶解于 100 ml 去离子水，Ca^{2+} 浓度为 10 mg/ml)和 $MgCl_2$ 储存液(8.36 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 溶解于 100 ml 去离子水，Mg^{2+} 浓度为 10mg/ml)至预冷的肉汤完成添加[1,5]。钙离子和镁离子浓度偏低将导致氨基糖苷类活性上升[11]，而过量的钙离子和镁离子含量将导致氨基糖苷类对铜绿假单胞菌的活性下降[11-12]。当不合适的钙离子和镁离子含量所带来的影响被充分认识后，其他离子包括锌离子和锰离子可能给一些药物的活性带来不良影响(如碳青霉烯类)[13]。

为精确测定特殊药物的敏感性结果，可能需要在 CAMHB 中添加其他物质。在之前“抗菌药物稀释”章节提及，达巴万星、特拉万星和奥利万星需在稀释法实验中添加 0.002%(V/V)的吐温 80 以阻止药物与塑料的结合[1,3,5]。另外，测试奥利万星时需使用未处理的微量板[1]。测定葡萄球菌对苯唑西林的敏感性(测试时使用苯唑西林而非头孢西丁)时肉汤中需补充 2% 的 NaCl，以更好检测葡萄球菌对苯唑西林的耐药性[1,3,5,14]。准确测定达托霉素时肉汤需调节钙离子浓度至 50 mg/L[1,3,5,15]。替加环素和奥玛环素敏感性试验要求 CAMHB 于测试当天新鲜配制或制备后冻存时间不超过 12 h[1,3,5]。铁载体 β 内酰胺类头孢地尔要求调节测试培养基的铁离子至标准化要求[3]。抗菌药物稀释后被分配到微量板中，5～10 块板叠成一组，顶上加盖或放置一空的微孔板以减少污染和液体蒸发。每一叠均放入塑料袋中，封口后立即冻存，最好－60℃或更低温度，若无超低温冰箱可置于－20℃。ISO 指南规定，制备后的药敏板可立即使用，储存时间不超过 3 个月，或规定的 QC 期限或其他证据显示抗菌药物未被降解[5]。需要注意的是如头孢克洛、克拉维酸和碳青霉烯类等高度不稳定的复合物，在保存过程中会失效。含有这些药物的微量板必须冻存于≤－60℃的温度。微量板一旦融化，应立即使用或丢弃而不是再次冰冻，因为冻融循环会导致 β 内酰胺类抗生素失效。基于上述原因，不能使用具有自除霜功能的－20℃家用冰箱。

3. 接种步骤 肉汤稀释法推荐的最终的接种浓度为 5×10^5 CFU/ml。制备接种物有 2 种方法，均需配至浊度为 0.5 麦氏标准。0.5 麦氏标准可购买商品化的，也可实验室自备：将 1.175%二

水氯化钡($BaCl_2 \cdot 2H_2O$)0.05 ml 与 1%硫酸(H_2SO_4)9.95 ml 混合[1]。为校准麦氏标准，应定期使用大肠埃希菌 ATCC 25922 进行菌落计数，依据是 0.5 麦氏标准相当于细菌浓度为 1×10^8～2×10^8CFU/ml。第一种接种物制备方法是直接菌落悬液法：挑取非选择性培养基上过夜生长的 4～5 个菌落培养物混悬于肉汤，制备 0.5 麦氏标准浊度[1,5,16]。第二种方法是肉汤培养法(亦称生长法)：细菌接种于支持生长的肉汤(如胰蛋白大豆肉汤)并孵育至合适浊度。通过加入肉汤校正浊度至 0.5 麦氏标准(1×10^8～2×10^8 CFU/ml，基于大肠埃希菌 ATCC 25 922 菌株)[1,5]。根据 MIC 板孔的体积和所使用的接种方法，细菌悬液被进一步稀释。例如，当肉汤孔的体积是 0.1 ml 和接种体积是 0.01 ml 时，初始菌悬液(浊度相当于 0.5 麦氏标准)被稀释 1∶20(5×10^6 CFU/ml)，进一步稀释 1∶10(0.01 ml 最终菌悬液至 0.1 ml 肉汤孔)可达到最终孔浓度 5×10^5 CFU/ml。或者，如果肉汤孔和接种物体积都是 0.05 ml，初始菌悬液被稀释 1∶100(1×10^6 CFU/ml)，进一步稀释 1∶2(0.05 ml 最终菌悬液至 0.05 ml 肉汤孔)。

多点金属或塑料接种器、多通道移液器或其他接种设备被开发用于收集和分配合适体积的菌悬液，将已稀释的菌悬液接种物转移至肉汤微量稀释板孔。制备好的接种物应在 30 min 内接种至肉汤微量板中，接种结束后应取液体划线传代培养进行纯度检查。最终每块板条上应留有一孔不含抗菌药物的生长对照和一孔未接种菌液的无菌对照。

ISO 标准参考方法要求对每一位患者分离株的测试菌悬液进行活菌落计数，以确保测试孔菌液浓度约为 5×10^5 CFU/ml。进行菌落计数时，接种后立即吸取 10 μl 生长对照孔菌液，并稀释至 10 ml 肉汤或生理盐水内(1∶1000 稀释)。100 μl 的稀释液平铺于合适的琼脂表面(1∶10 稀释)，然后孵育过夜。根据 ISO 标准，观察到的菌落数量的可接受范围为：20～80 个，相当于 2×10^5～8×10^5 CFU/ml，否则该菌株的 MIC 结果无法报告[5]。CLSI 推荐每季度用大肠埃希菌 ATCC 25 922 执行菌落计数，以确保获得的常规最终接种菌量接近 5×10^5 CFU/ml[1]。由于基于不同细菌种属的菌落计数存在一些可变因素包括细胞大小、是否有荚膜、悬液团块或其他生长因素和培养物代数，因此，可能需要对接种稀释程序进行调整，以提供最终最佳的孔浓度 5×10^5 CFU/ml。此外，接种量不够可能是某些细菌诱导耐药机制(如 β 内酰胺酶)检测的一个重大问题，这些菌株基于敏感 QC 菌株的 MIC 可能还没有认为是个问题。

4. 孵育 接种完成后，应密封每块微量稀释板或将不超过 5 块板叠一起用塑料胶带或封口膜封口后放入塑料袋中，以防止培养前液体蒸发。除非 CLSI 或 ISO 另有关于某些抗菌药物-细菌组合的特殊说明外，板条需放入 35℃ 空气环境(CLSI：35±2℃，ISO：35±1℃)培养 18±2h 后阅读结果[1,5]。培养箱应保持足够的湿度避免板内液体蒸发，但不能太湿以免冷凝水污染。不动杆菌属、洋葱伯克霍尔德菌复合体和嗜麦芽窄食单胞菌需孵育 20～24 h。当测定万古霉素耐药肠球菌、苯唑西林耐药葡萄球菌和万古霉素耐药或中介葡萄球菌时推荐培养时间延至 24 h[1,3,5]。非苛养菌的培养无须补充 CO_2[1,3,5]。

5. 解释和结果报告 阅读和记录临床菌株 MIC 前，应先阅读生长对照孔以检查接种物的活力并且检查接种物的纯度。质控菌株和临床菌株应同时进行试验。如果活力和平板上的纯度不符合 CLSI 或 ISO 要求，实验无效。此外，ISO 标准要求“已建立合适的接种物细胞数量浓度”(参考“接种步骤”章节)。质控菌株获得的 MIC 数据应处于 CLSI、EUCAST 或相关监管机构限定的范围内(参考“稀释法质量控制”章节)。各种阅读装置均可用于微量稀释板 MIC 阅读。最简便和可靠的是使用带抛物线式放大镜的板条支架从微量稀释板底部对孔内生长状况进行肉眼观察。菌株生长状况的判断最好与生长对照孔进行对比，通常为整孔浑浊生长或孔底有单个、多个沉淀。绝大多数的 MIC 是指能完全抑制肉眼可见生长的最低浓度。甲氧苄啶或磺胺药物出现的拖尾现象应该忽略，MIC 读取抑制生长超过 80%的点[1,5]。另外，测定革兰阳性球菌对氯霉素、克林霉素、红霉素、利奈唑胺、特地唑胺和四环素时，应忽略紧随足量生长孔(如明显的纽扣样沉淀或整孔浑浊生长)之后的针尖样生长[1]。微量稀释试验出现单个跳孔时，阅读最高孔 MIC。当出现超过一个以上跳孔的药物结果不能报告[1]。

一旦确定了 MIC，下一步就是使用临床相关

折点，有时称为解释标准，即将 MIC 分类为敏感、中介、剂量依赖敏感、耐药或非敏感，见表 73-1。

折点可在 FDA 网站[17]、CLSI M100 标准[3]、CLSI 网站[18]或 EUCAST 网站[4]查找。参考第71章以进一步讨论折点和这些标准制定组织折点间的差异。除非另外说明，同样的折点和关于使用这些折点的备注可应用于肉汤微量稀释法、肉汤宏量稀释法和琼脂稀释法测定的 MIC。

6. 优点和缺点 肉汤微量稀释法的主要优点是目前全球公认的抗菌药物敏感性试验标准化参考方法。已有关于肉汤微量稀释法大量翔实的数据、持续改进的方法被研发用于帮助提升该方法的可重复性、室内和室间可比性。科学和监管机构间的合作包括 CLSI 和 EUCAST，使得 ISO/FDIS"国际标准"于 2006 年正式发布，这是首个全球公认的肉汤微量稀释法药敏试验标准[19]。ISO 药敏试验标准更新版于 2018 年发布[5]。这种合作和由此产生的全球标准的重要性不应被低估。ISO 20 776 公布之前，各国使用肉汤微量稀释法测定 MIC 的方法学存在一些差异。这意味着在一些实验室，对于同一株细菌使用不同的肉汤微量稀释法经常会出现不同的 MICs。CLSI 和 ISO 方法学间小的差异持续存在，而 ISO 20776-1 文件声明 ISO 方法与 CLSI M7 标准描述的 CLSI 肉汤微量稀释法"本质上是一样的"[5]。这些方法学上的微小差别，包括孵育范围(如 CLSI：35℃±2℃和 ISO：35℃±1℃)通常认为无异议、可接受。当由于一些原因导致临床相关折点的差异持续存在时(参考第 71 章)，方法学本身全球标准的建立在质量和全球 MIC 结果可比性上是重要的进步。

肉汤微量稀释法的另一个优点是接种和阅读过程简单且可同时对单株菌株进行多种抗菌药物的测试。商品化制备的冻干抗菌药物板的选择可使实验室满足 ISO/CLSI 全球参考肉汤微量稀释法标准。这些产品提供孔内含预制抗菌药物稀释液的冷冻板。冻干板亦可选择，然而，如前所述，使用冻干板意味着试验的执行并不是按照标准参考肉汤微量稀释法(第 73 章)。

多个研究证明，绝大多数类别抗菌药物，标准参考肉汤微量稀释法所获得的 MIC 与人 PK 水平、动物模型和临床试验疗效间具有相关性。PK/PD 研究用于建立临床相关折点，用以判断一株细菌的 MIC 结果是敏感或者耐药，以及指导患者治疗。

全球标准的肉汤微量稀释法的缺点包括测试体积小带来的挑战、实验技术要求、由于实验步骤细小差异带来的 MIC 结果变化或细菌固有的可变性(如表达 β 内酰胺酶等)。肉汤微量稀释法中使用小体积进行(参考"肉汤微量稀释法-接种步骤"章节)使得对某些耐药机制的检测如 β 内酰胺酶诱导耐药和异质性耐药群体变得困难。进行肉汤微量稀释法操作及能排除操作中的问题需要有经验的实验室员工，也是参考标准肉汤微量稀释法的一个缺点。最明显的缺点是即使由技术专家按照当前 CLSI 和 ISO 描述的参考标准进行操作，该方法仍持续存在生物学和技术可变性如 MIC 结果往往存在±1 个稀释度误差。此外，不正确的接种物制备和微孔板中生长终点的判读能导致一个 MIC 结果出现大于±1 稀释度的差异。对于某些微生物/药物组合，如肠杆菌科细菌和 β 内酰胺类抗菌药物，同一株菌株的 MIC 范围可相差 5 个稀释度[20]。尽管一些误差是生物性的，但是 CLSI 和 ISO 持续更新指南文件并修改方法学以消除可能存在的一些技术误差。

(二)肉汤宏量稀释法

下面描述的肉汤宏量稀释法是测定抗菌敏感性的标准参考方法[1]，除了在试管中制备抗菌药物稀释液，至少为每管 1 ml，不是用微量滴定板外，本方法与本节前面描述的肉汤微量稀释法类似。

1. 抗菌药物稀释 按 CLSI 和 ISO 标准和本章节"肉汤微量稀释法-药敏板的制备、补充及储存"中的描述准备储存液[1,5]。

宏量稀释法试验使用清洁无菌 13 mm×100 mm 带螺旋盖、塑料或金属塞或棉花塞试管。试管中抗菌药物稀释液的制备采用肉汤对倍体积系列稀释，用同一根移液管量取所有的稀释液和第一管中的抗菌药物储存液，后续的每一步稀释，都更换新的移液管。每一次稀释每管中最小终体积为 1 ml。CLSI M100 提供了一个制备稀释液的表格和步骤。由于当等量的接种物加入后，抗生素被 1∶2稀释，抗菌药物稀释液的制备应为终浓度的 2 倍[参考"肉汤宏量稀释(试管)法-接种步骤"章节])。为了最大程度避免蒸发和抗菌药物降

解，试管应盖紧盖子并储存于 4～8℃。如果抗生素稀释管制备当天未能使用，应将其立即储存于≤－20℃（最好是≤－60℃）。绝大多数药物，稀释液应在制备后 5 天内或质控范围处于有效范围内使用（见“稀释法质量控制”章节）。

2. 试管的准备、补充和保存　CAMHB 被推荐用于非苛养菌肉汤宏量稀释法培养基。CAMHB 的制备，包括阳离子调整，应遵循 CLSI 和 ISO 方法[1,5]和本章描述的内容（参考“肉汤微量稀释法-药敏板的制备、补充及储存”章节）。

3. 接种步骤　受试菌最终接种菌量约为 5×10^5 CFU/ml[范围$(2\sim8)\times10^5$ CFU/ml]。标准接种物的制备可按“肉汤微量稀释法-接种步骤”节描述或 CLSI 和 ISO 方法[1,5]，采用肉汤培养法（亦称生长法）或直接菌落悬浮法。简单的说，即菌株接种到可支持其良好生长繁殖的肉汤（如胰蛋白胨大豆肉汤）中孵育至肉眼可见浊度。菌液浊度调整到 0.5 麦氏标准（约 10^8 CFU/ml）。也可从非选择性琼脂平板上挑取 4～5 个过夜培养的纯菌落直接悬浮于肉汤中，配成 0.5 麦氏标准[1]。菌液制备后 15 min 内，稀释已校正的接种菌悬液于肉汤中。此步骤可通过将 0.5 麦氏浊度悬液稀释 1∶150 完成，此时试管中菌液浓度约为 1×10^6 CFU/ml。当稀释后的 1 ml 菌悬液加入含 2 倍浓度稀释药物的 1ml CAMHB 试管中，最终接种菌量为 5×10^5 CFU/ml。不含抗菌药物肉汤作为细菌生长活性对照。菌悬液制备好后 30 min 内完成所有接种实验，并取部分接种液涂布于平板培养以检查细菌纯度。

4. 孵育　试管于 35℃±2℃空气环境孵育 16～20 h 后阅读 MIC 结果。测定万古霉素耐药肠球菌和苯唑西林耐药、万古霉素耐药或万古霉素中介葡萄球菌的 MIC 时应延长孵育至 24 h[1,3,5]。其他非苛养菌的孵育时间可能有所不同。不动杆菌属、洋葱伯克霍尔德菌复合体和嗜麦芽窄食单胞菌要求孵育时间为 20～24 h[1,3,5]。

5. 结果解释和报告　阅读和记录受试菌株 MIC 前，应先阅读生长对照以检查接种物的活力，以及检查传代平板确认是否污染，并确认质控菌株的 MIC 在控（见“稀释法质量控制”章节）。判断含抗菌药物试管中细菌生长或被抑制最合适的方法是与生长对照比较。通常，细菌生长为肉眼可见浊度，单个沉淀菌苔直径＞2 mm，或直径较小的几个菌苔。以裸眼判断，完全抑制肉眼可见微生物生长的最低浓度记录为 MIC。与肉汤微量稀释法和琼脂稀释法一样，甲氧苄啶或磺胺类药物可见拖尾终点，此时与生长对照相比 80％或以上细菌生长被抑制应记录为 MIC[1,5]。其他解释问题如“跳管”现象，指细菌在某个药物浓度下没有观察到生长，但在较低和较高的药物浓度时呈现生长。根据 CLSI M07，当宏量稀释法出现单个“跳管”现象时，记录最高管的 MIC。如果单个药物的“跳管”现象发生于多个浓度，不应记录这些结果，需重复实验[1]。

一旦确定了一个 MIC，下一步就是使用临床相关折点，将 MIC 分类为敏感、中介、剂量依赖敏感、耐药或非敏感（表 73-1）。折点可在 FDA 网站[17]、CLSI M100 标准[3]、CLSI 网站[18]或 EUCAST 网站[4]查找。除非另外说明，同样的折点（如解释标准）和关于使用这些折点的备注可应用于肉汤微量稀释法、肉汤宏量稀释法和琼脂稀释法测定的 MIC。

6. 优点和缺点　肉汤宏量稀释法是一种易于标准化的、可靠的标准参考方法，对以研究为目的或测试一种药物对一株细菌的 MIC 可能很有用。由于每管中使用大体积及更多数量的细菌细胞，肉汤宏量稀释法在检测一些细菌的药物-微生物组合的耐药性中可能更有效[21-22]。某些情况下，宏量稀释法所使用的大体积可使终点判读更容易，如报告甲氧苄啶/磺胺异噁唑对金黄色葡萄球菌的 80％抑制[23]。

由于工作量大和有更简便的肉汤微量稀释标准参考方法，本方法一般不用作常规敏感性试验，在药物研发中亦不作为常用的标准方法。

三、稀释法试验：琼脂稀释法

下面描述的琼脂稀释法是测定抗菌敏感性的标准参考方法[1]。对一些菌种，琼脂稀释法是首选方法（厌氧菌）或仅有可接受的参考方法（淋病奈瑟菌、幽门螺杆菌）。一种抗菌药物与琼脂培养基混合，每块平板中含不同浓度的药物。使用接种设备，接种物可单独或同时点种于琼脂表面，通常每块平板可接种 32～36 个点[1]。

初始储存液制备参考“肉汤微量稀释法-抗菌药物的稀释”章节。此外，CLSI 和 ISO 方法列出

了最常用抗菌药物溶解、稀释和制备贮存液的操作步骤[1,5]。

(一)培养基的制备、补充和储存

MHA是绝大多数常见需氧菌和兼性厌氧菌的推荐培养基[1]。脱水琼脂基础培养基现有商品可售,制备时按制造商说明书要求进行。MHA的性能标准和离子成分已按药敏试验方法确定。根据已建立的标准配制的专用于药敏试验的MHA,无须额外添加钙和镁离子来达到预期实验结果[1,4]。灭菌前,融化的琼脂通常精确地等分在螺旋盖管中,每管的体积足够将所需抗菌药物浓度稀释10倍。每一管中的琼脂对应一种药物的一种测试浓度,高压蒸汽灭菌器法121℃灭菌15 min后琼脂需在一预热的48~50℃水浴箱中平衡。一旦熔化的琼脂达到平衡温度,加入适当体积的抗菌药物,轻轻颠倒混匀管内容物,然后倒入放置于水平面上的直径100 mm的圆形或方形无菌塑料平皿中,待琼脂凝固。制备无抗菌药物的琼脂平板用于生长对照控制。所有平板中琼脂厚度应为3~4 mm,检查每批琼脂的pH,确认可接受的pH范围为7.2~7.4[1]。

熔化的培养基灭菌及温度平衡后,任何必要补充剂可以和药物溶液同时以无菌操作的方式加到MHA中。如测试链球菌属细菌,推荐添加5%脱纤维羊血或马血[1,5]。但添加的羊血可能会对磺胺嘧啶对某些微生物的抗菌活性产生拮抗作用[24]。血液的存在也会影响新生霉素、萘夫西林和头孢菌素对肠球菌属细菌的体外抗菌活性[25-26];因此,除非细菌生长必要,无须额外加血(参考第76章检测苛养菌可接受的方法)。测定葡萄球菌属细菌对苯唑西林的敏感性时,琼脂中应添加2%的氯化钠[1,27]。测定磷霉素需补充25 μg/ml的6-磷酸-葡萄糖[1,4]。

制备好后,琼脂平板应密封在塑料袋中,4~8℃保存。一般情况下,应在制备后5天内使用或同时做的质控菌株的MIC在可接受范围内才可使用。但是某些药物不够稳定,平板需现做现用,不能储存(如碳青霉烯类、头孢克洛和克拉维酸)。测试替加环素和奥玛环素时,MHA必须在药物稀释液添加到琼脂平板的当天新鲜配制[1,3]。菌液接种前,冰箱中储存的琼脂平板应先平衡至室温,提前将琼脂表面烘干。

(二)接种步骤

与肉汤微量稀释法和宏量稀释法一样,琼脂稀释法的最终接种量为5×10^5 CFU/ml(10^4 CFU/点)。标准接种物的制备可按"肉汤微量稀释法-接种步骤"节描述[1,5],采用直接菌落悬浮法或肉汤培养法(亦称生长法)。简单说来,对于直接菌落悬浮法,从非选择性琼脂平板上挑取4~5个过夜培养的纯菌落直接悬浮于肉汤中,配成0.5麦氏标准浊度(约10^8 CFU/ml)。或者采用肉汤培养法,菌株接种到可支持其良好生长繁殖的肉汤(如胰蛋白胨大豆肉汤)中孵育至肉眼可见浊度。菌液浊度调整到0.5麦氏标准浊度[1]。一旦校正后的细菌接种物制备完成,应使用移液器、校正的接种环或一种更常用的接种设备接种于抗菌药物平板上。制备好的菌悬液,最好在15 min内接种于含抗菌药物的琼脂平板上,因为时间的延长可能会导致接种菌量的变化。对于绝大多数菌种,培养物校正至0.5麦氏标准约含$(1\sim2)\times10^8$ CFU/ml,5~8 mm直径点上最终所需的接种菌量是10^4CFU/点。CLSI M07中提及,以3 mm针接种器点种2 μl,0.5麦氏悬液应以无菌肉汤或生理盐水1∶10稀释获得10^7 CFU/ml浓度[1]。琼脂上的最终接种菌量约10^4 CFU/点。当使用1 mm针接种器点种0.1~0.2 μl时,初始悬液不应进行稀释[1]。

琼脂平板表面在接种前必须干燥,而无药生长对照平板应在接种开始前首先进行点种。然后继续从最低药物浓度的平板点种到最高药物浓度的平板。最后,点种第二块无药生长对照平板,用于检查是否存在污染或明显的抗菌药物残留。所有平板应清楚标记,以便知道每个平板上测试的不同菌株位置。

(三)孵育

接种后的平板在室温放置几分钟,以便培养基完全吸收接种液,然后将平板倒置,在35℃空气环境中孵育16~20 h后读取结果[1]。不动杆菌属、洋葱伯克霍尔德菌复合体和嗜麦芽窄食单胞菌要求孵育至20~24 h[1,3,5]。检测万古霉素耐药肠球菌属和苯唑西林耐药、万古霉素耐药或万古霉素中介的葡萄球菌属细菌时,应孵育至24 h[1,3,5]。非苛养菌在大气环境

孵育，无须提高 CO_2 浓度。平板置于室温时间不超过 30 min。

(四)结果解释和报告

阅读和记录临床分离株的药敏试验结果前，应先同时检查进行药敏测定的相应质控菌株，以确认它们的结果处于可接受范围内(参考"稀释法质量控制"章节)并检查无抗菌药物生长对照平板上菌株的活力和纯度。判读每一种抗菌药物的终点时，最好放置在一个黑色背景上读取它们抑制肉眼可见菌株生长的最低浓度，即 MIC。单一菌落或由初始接种物留下的一层淡淡薄雾均不应视为生长。如果 2 个或多个菌落持续存在于一个处于原来明显终点抗菌药物浓度之上，或在抗菌药物低浓度时没有生长但在较高浓度时却生长，应对菌株的纯度进行确认并重复试验。接种物中含对磺胺类和甲氧嘧啶药物抗菌活性有拮抗作用的物质时可造成"拖尾"或阅读终点不明确[24-25]。因此，对于这些抗菌药物 80%或以上细菌生长被抑制出现的终点记录为 MIC。虽然不多见，但拖尾现象也可能见于某些微生物和某些抑菌药物如氯霉素、四环素类、利奈唑胺和奎奴普丁/达福普汀[1]。

一旦确定了 MIC，下一步就是使用临床相关折点，将 MIC 分类为敏感、中介、剂量依赖敏感、耐药或非敏感(表 73-1)。折点可在 FDA 网站[17]、CLSI M100 标准[3]、CLSI 网站[18]或 EUCAST 网站[4]查找。除非另外说明，同样的折点(如解释标准)和关于使用这些折点的备注可应用于肉汤微量稀释法、肉汤宏量稀释法和琼脂稀释法测定的 MIC。

(五)优点和缺点

本章和 CLSI M07 描述的琼脂稀释法是公认的敏感性试验标准参考方法。琼脂稀释法是高效的，可同时测试一些药物对许多菌株的活性(如评价制药工业中的新药)。同肉汤稀释法相比，琼脂法更易观察到微生物污染或菌群异质性。如 ISO 20776-1[5]描述，琼脂稀释法是测试磷霉素和美西林最好的参考方法，尽管肉汤微量稀释法目前认为是测定 MICs 的国际参考方法[5]。然而，对于厌氧菌、淋病奈瑟菌和幽门螺杆菌，琼脂稀释法是首选的敏感性试验方法。琼脂稀释法的主要缺点准备平板耗时且劳动强度大，特别是每种菌株需测试的不同抗菌药物的数量多，或者是只有几株菌需要进行测试时。此外，随着肉汤微量稀释标准参考方法的日益卓越，对于新的抗菌药物，琼脂稀释法评估并不总是完全有效的。不推荐琼脂稀释法用于测试达托霉素和达巴万星[3]。

四、稀释法质量控制

质量控制措施用于评估实验步骤的精密度和准确性，监测试剂性能，评价不同工作人员的实验操作能力。自 1980 年以来，通过肉汤微量稀释法已建立绝大多数质控范围。美国和欧盟部分监管机构要求开展肉汤微量稀释法、宏量稀释法和琼脂稀释法的比较研究。所以，除少数情况外(如厌氧微生物的质控范围限定于肉汤微量稀释法和琼脂稀释法)，绝大多数药物-微生物组合已有一套质控范围并应用于微量、宏量和琼脂稀释法[1,3,5,8-9]。

(一)菌株选择

质量控制中的关键要素是选择和使用遗传性状稳定的参考菌株，其理想的 MIC 值应处于每一种受试抗菌药物 MIC 浓度的适中范围[1,3,5,9]。即受试药物的浓度范围最好能包含已知参考菌株已确定的 MIC 范围上下 2 个稀释度。大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853、粪肠球菌 ATCC 29212 和金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 是 ISO/CLSI/EUCAST 列表推荐用于非苛养菌稀释 MIC 法的参考菌株[3-5]。根据患者受试菌株(如葡萄球菌属、肠杆菌科细菌等)和 ISO/CLSI/FDA 或 EUCAST 提供的指南，决定质控菌株的选择及对菌株进行常规试验还是补充试验的要求。产 β 内酰胺酶质控菌株如大肠埃希菌 ATCC 35218(TEM-1)、大肠埃希菌 NCTC 13353(CTX-M-15)、肺炎克雷伯菌 ATTC 700603(SHV-18、OXA-2、OmpK35 和 OmpK37 突变)、肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705(KPC-2、TEM、SHV)、肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-2814(KPC-3、SHV-11、TEM-1)和鲍曼不动杆菌 NCTC 13304(OXA-27)推荐用于常规或补充测试 β 内酰胺/β 内酰胺酶抑制剂(β-lactam/β-lactam inhibitor，BL/BLI)合剂的质控菌株[3-5]。这些 β 内酰胺酶产生株的选择，可用于比较 β 内酰胺与 BL/BLI 合剂

活性的差异。在没有抑制剂的情况下检测β内酰胺是重要的，可判断质控菌株并未丢失产生β内酰胺酶的能力。质控菌株应从可靠的来源获取，如美国典型菌种保藏中心（American Type Culture Collection，ATCC）或其他可靠的商业来源。有时上述已批准的质控菌株不能满足常规质控和（或）质量保证（quality assurance，QA）目的[如不能可靠地检测一个实验条件问题或不能完成问题排查，校验和（或）验证，或评估目的]。参考CLSI M23关于选择和获得已批准新质控菌株的标准[9]。

常用的质控菌株应低压冻干储存或≤－60℃冻存于可接受的稳定剂如50%胎牛血清肉汤、10%～15%甘油胰蛋白大豆肉汤、脱纤维羊血或脱脂牛奶中[2]。EUCAST推荐储存于－70℃的甘油肉汤玻璃珠（或类似商品）的简单方法[4]。一些质控菌株尤其是那些含质粒介导耐药株（如大肠埃希菌ATCC 35218），研究显示储存于－60℃温度以上将丢失质粒。CLSI M100文件提供了处理某些质控菌株的特殊方法[2]。通过菌株传代于非选择性营养琼脂培养基获得质控菌株工作培养物。仅从首代工作培养物获得下一代的传代培养物，最多连续一周。CLSI和EUCAST亦提供正确储存和传代步骤的指南[2,4]。

（二）MIC范围

每年CLSI M100文件附表或EUCAST网站中列出了各种参考菌株可接受的质控MIC范围[3-4]。ISO参考CLSI质控范围[5]。每个临床微生物学实验室均应备有此文件。失控结果是指MIC测定结果不在可接受的质控范围内。某些失控结果与实验所用培养基直接有关，如铜绿假单胞菌ATCC 27853对庆大霉素MIC偏高提示Mueller-Hinton培养基中二价阳离子浓度偏高或pH偏低；而MIC偏低则提示二价阳离子浓度偏低或pH偏高[1,5,10]。钙离子浓度偏低将导致达托霉素MIC升高[1,5,15]。大环内酯类和氟喹诺酮类抗菌药物的MIC受pH变化的影响较小[28]。虽然粪肠球菌所致感染的治疗不推荐使用甲氧苄啶-磺胺甲噁唑，但粪肠球菌ATCC 29212的检测结果可用来判断培养基中是否含超量的胸腺嘧啶，它在体外影响抗叶酸药物的活性。当甲氧苄啶-磺胺甲噁唑的MIC超过0.5/9.5 μg/ml时提示存在干扰物质[1]。更多的质控问题排除指南参考每年CLSI M100附表[3]。

（三）批次和批号质控

自行配制的新试剂批次或商业来源新批号的琼脂药敏平板、药敏板条，都应按CLSI M07和M02文件描述对其抽样进行质量控制和无菌试验[1-2]。参考菌株的抗菌药物MIC测定结果应在CLSI或EUCAST可接受的范围内[3-4]。若准确度不达标，则新批次或批号的材料应废弃，获得的患者抗菌药物敏感试验结果存在问题，不应进行报告。同样，若未接种的平板或药敏板无菌试验不达标，则该批材料也应废弃。除了进行参考菌株质量控制措施以外，对日常临床菌株的敏感性结果进行仔细审核也很重要，如发现一些罕见或异常的耐药表型，提示试剂或技术上存在问题。

（四）测试频率

除了批次和批号的质控外，每日也应进行质控，或至少每日对用于临床菌株测定的平板或药敏板应进行质控。此外，CLSI推荐了2种MIC（或纸片扩散法）的质控测试频率从每天减少至每周的可行的方案。仅当MIC（或纸片扩散法）试验每周至少进行一次时，可采用每周质控方式。另外，美国监管临床实验室试验的医疗保险和公共医疗补助服务中心通过临床实验室改进修正案，建立减少质控从每天到每周的要求（2016年1月1日生效），仅适用于个体质量控制计划已实施的情况（第2章）。

每日质控时，每种药物-参考菌株组合20个结果中不超过1～30个连续结果中不超过3个超出质控范围，认为满意。如果超出这种频率，则实验室必须采取纠正措施，找出错误来源并按下文采取纠正措施。然而，若每日质控测试并没有发现过多的错误率，则按CLSI M07（M02）指南指出的2个计划之一，可以转为如下所述的每周质控[1,3]。测试间隔转换为每周质控时，应先对每个药物-参考菌株组合进行20～30天的连续测定并得到每个组合的20～30个试验结果（如MIC或抑菌圈直径值）。若每个组合的20个结果中不超过1个，30个结果中不超过3个超出质控范围，可转换为每周质控。此外，执行流线型的15天重复计划

(3×5天)，5天每天对每一株相关质控菌株重复3次(分别接种)[1]。若没有或仅有1个结果超出质控范围，也可转换为每周质控。若2或3个结果超出质控范围则需要再同样获取15个结果。在每周质控中若出现单个结果失控，则应进行复测，若复测结果在控则无须采取其他措施。若复测结果也失控，则需要重新进行5天的每日质控用以记录质控结果恢复到在控状态或证明采取了有效措施解决了问题。参考CLSI M07(M02)关于"质控菌株失控结果和纠正措施"的指南[1]。

五、纸片扩散试验

CLSI和EUCAST都描述了标准参考纸片扩散法[2,4]。这些方法是类似的，然而，对于一些药物-微生物组合，存在纸片含量和临床相关折点差异。苛养菌使用的培养基和孵育时间亦有差异(第76章)。试验时，将在含特定浓度抗菌药物中浸润过的商品化6 mm滤纸片，贴在已接种有覆盖整个琼脂表面并形成"菌苔"的受试菌的琼脂平板表面。纸片中的药物在琼脂中扩散。随着离纸片距离的延长，抗菌药物浓度呈对数下降，在纸片周围的琼脂培养基表面形成了一个浓度梯度。随着药物的扩散，接种于表面且不被琼脂中抗菌药物浓度抑制的细菌继续繁殖直至在琼脂表面形成肉眼可见的菌苔样生长。在药物浓度能抑制的区域，无细菌生长，形成围绕纸片的抑菌圈。

纸片扩散法操作规程已经标准化，主要用于测试常见的、快速生长的细菌[2,4,29]。该方法不适用于评价生长速度存在明显差异细菌的抗菌药物敏感性(如某些苛养或厌氧细菌)。然而，通过加入营养丰富的培养基介质及改良孵育条件，本方法也可可靠地测定一些特定苛养菌(包括肺炎链球菌、流感嗜血杆菌等)的药物敏感性(第76章)。

抑菌圈直径受抗菌药物在琼脂表面扩散率的影响，不同药物有所差别，取决于药物分子大小及亲水性。而抑菌圈的大小，与MIC值的对数成反比例函数关系，这在本章前面已讨论过。阅读并记录抑菌圈直径。参考FDA、CLSI或EUCAST(表73-1)颁布的临床相关抑菌圈直径折点，将抑菌圈直径分类为敏感、中介、剂量依赖敏感、耐药或非敏感[3,4,7]。第71章描述了折点制定的流程。虽然绝大多数国家的实验室使用FDA、CLSI或EUCAST折点，但有些根据当地医疗监管机构的规定使用本国特定的折点。

(一)抗菌药物纸片

纸片扩散法所用纸片中抗菌药物的含量是标准化的，但CLSI和EUCAST方法间纸片的含量是有差别的[3,4]。每张纸片中抗菌药物的最佳浓度，是在新药研发早期检测几种不同药物浓度的纸片，通过柱状图、散点图和回归线评估其与MIC结果的相关性来决定的(第71章)[4,9]。

商品化抗菌药物纸片通常存放在单独的配有干燥剂的容器内，以确保无水环境。超过规定的过期日期不得使用，使用前应按厂家说明书提示储存，一般为冷藏环境(2～8℃)或－20℃或更低的冷冻(无霜)冰箱(CLSI推荐将纸片筒储存于≤8℃不超过1周，或使用前冷冻于≤－14℃或更低温度[2])。某些不稳定的药物(如亚胺培南、头孢克洛和克拉维酸合剂)，使用前处于冷冻状态能更好地保持稳定性。未开启的纸片容器在使用时，应提前1～2 h从冷藏或冷冻环境拿出。使纸片在打开前温度恢复至室温，减少外界温暖空气和冰冷纸片接触时产生的冷凝水量。可使用一种配备一个紧密盖子的商业化机械纸片分配器，提供足够的干燥剂，不使用时储存在冰箱，但在打开之前恢复到室温。

(二)纸片扩散所用琼脂培养基

CLSI和EUCAST方法学推荐的非苛养菌标准参考纸片扩散试验的培养基是MHA[2,4]。选择这种无添加培养基的原因有以下几点：①已证明敏感性试验批次间重现性良好；②磺胺、甲氧苄啶和四环素抑制剂的含量低；③能支持绝大多数非苛养细菌病原体生长；④多年的研究数据和临床经验已验证了其性能的准确性。苛养菌如嗜血杆菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌和链球菌等，虽然在无添加MHA琼脂上生长不佳，但如第76章所述，可采用补充添加剂或改良培养基的方式亦可进行纸片扩散法试验。

Mueller-Hinton琼脂平板已商品化，或根据制造商的要求购买商品化脱水干粉制备琼脂。如果自制琼脂，当按要求配制的琼脂经测试满足

CLSI 和 EUCAST 限制的 QC 接受范围方可使用[3-4]。制备好的琼脂高压后立即置于 45～50℃水浴中。冷却后，在一水平的台面上将琼脂倾注至圆形塑料的平底培养皿内，厚度应一致约 4±0.5 mm。琼脂厚度超过 4 mm 可能会导致假耐药结果(抑菌圈过小)，反之可能因抑菌圈直径过大导致假敏感[2,4]。

培养基配制后，应检查每批 Mueller-Hinton 琼脂的 pH，确保室温下琼脂的 pH 在 7.2～7.4 之间，这意味着 pH 的测量必须在琼脂已凝固后进行。可以通过取少量琼脂在烧杯或杯子内 pH 电极尖端附近凝固，将琼脂浸泡在足够量中性蒸馏水中，或通过使用一个适当的校准表面电极来实现。pH 超出 7.2～7.4 可能对药敏试验结果产生不利影响。pH 太低，氨基糖苷类、大环内酯类和氟喹诺酮类药物的抗菌活性会降低，而其他药物(如青霉素类和四环素类)的抗菌活性可能会增强。如 pH 太高，可能会出现相反效果[2,4]。

新鲜制备的培养基应在当天使用或存放在于冰箱(2～8℃)。冷藏时应该用塑料袋包裹，以尽量减少水分蒸发。CLSI M02 标准提示，平板可稳定 7 天使用，但若有措施防止干燥且试验时 QC 处于接受范围可保存更长时间。使用前，若琼脂表面上有多余的水分，平板应该放在一孵育箱中(35℃±2℃)或室温下带盖半开着置于层流罩里，直到水分蒸发(通常为 10～30 min)。待接种的培养基，琼脂表面或在培养皿盖上应无可见的水珠[2]。

Mueller-Hinton 培养基的各种成分或补充成分可能会影响敏感性试验结果；因此，必须进行适当的质量控制程序(见“纸片扩散法质量控制”章节)，抑菌圈直径必须在可接受范围内。例如，培养基含过量的胸腺嘧啶核苷酸或胸腺嘧啶可使磺胺类及甲氧苄啶的抑菌活性失效，导致抑制圈直径变小或不明显[2]。一些微生物因此会对这些药物表现出假耐药。二价阳离子浓度的变化，主要是钙和镁，能影响氨基糖苷类和四环素对铜绿假单胞菌的结果[2]。阳离子含量太高会使抑菌圈直径变小，而含量太低则效果相反。用 Mueller-Hinton 培养基来测试非苛养菌时不应添加羊血，因为血液可明显改变某些药物对细菌的抑菌圈直径[25]。由于分子扩散性差，纸片法检测达托霉素的结果不可靠。另外，钙离子含量不足可使抑菌圈变小，过高可使抑菌圈变大。锌离子过量可能使碳青霉烯抑菌圈变小[13]。每批次 MHA 性能的测试应遵循 CLSI 和 EUCAST 表中的 QC 限制[3-4]。

(三)接种步骤

为确保纸片扩散法敏感试验结果的重复性，接种物必须标准化[2,4,29]。接种物可按本章(参考“肉汤微量稀释法-接种步骤”章节)前面描述的采用直接菌落悬浮法或肉汤培养法(亦称生长法)。应使用相当于 0.5 麦氏浊度的 $BaSO_4$ 浊度标准或其光学当量(例如，乳胶颗粒悬浮液)。$BaSO_4$ 0.5 麦氏浊度标准应按 CLSI M02 标准或 EUCAST 网站的描述制备[2,4]。

当甲氧苄啶-磺胺甲噁唑采用直接菌落悬液法测定时，来自血琼脂培养基上的菌落可能会携带不少甲氧苄啶或磺胺类拮抗剂而使敏感菌株的抑菌圈里产生薄雾样生长。

MHA 平板上的涂布接种应在菌悬液浊度调好后 15 min 内完成。将无菌棉签浸到悬浮液中，旋转数次，轻轻地在液面上方的管壁按压，去除棉签里多余的菌液。然后将棉签在整个琼脂表面来回涂布 3 次，每次旋转平板 60°，以确保菌液均匀分布。最后在琼脂的边缘涂一圈。盖子开着 3～5 min，但不要超过 15 min，以便药敏纸片贴上去前多余的菌液被琼脂充分吸收。

(四)抗菌纸片

平板接种后 15 min 内，选择所需抗菌药物纸片均匀地贴在琼脂表面，相邻两纸片距离至少 24 mm(纸片中心距离)。纸片可使用无菌钳一片一片放置，或更常用的是将纸片放在一个机械分配器内，然后轻压在琼脂表面上，使纸片均匀接触琼脂。150 mm 直径的平板贴的纸片不超过 12 张，100 mm 直径的平板不超过 5 张，以避免抑菌圈重叠。一些抗菌药物扩散很快，因此，一旦纸片接触到琼脂表面，就不能再移动[2]。

(五)孵育

纸片贴好后 15 min 内，对于绝大多数非苛养菌，将平板倒置并放到 35℃±2℃空气环境下孵育 16～18 h(EUCAST 标准为 35℃±1℃孵育 16～20 h)[2,4]。不动杆菌属、洋葱伯克霍尔德菌复合体和嗜麦芽窄食单胞菌要求孵育至 20～24 h[1,3,5]。检测万古霉素耐药肠球菌属和苯唑西

林耐药、万古霉素耐药或万古霉素中介的葡萄球菌属细菌时，应孵育至24 h[2-4]。孵育前放置时间超过15 min不可接受，这会使抗菌药物预扩散过度。非苛养菌解释标准是基于受试菌在空气环境中培养，CO_2环境会显著改变某些药物如氨基糖苷类、大环内酯类和四环素类抑菌圈直径。因此，平板不应该放置在有较高CO_2浓度的环境中孵育。但某些需在5%CO_2环境中孵育的苛养菌，其抑菌圈直径解释标准是建立在这样的培养条件基础上的(见第76章)。

(六)结果解释和报告

若接种菌量恰当，抑菌圈应该是均匀圆形并且菌苔生长是汇合的。菌苔由单独分开的生长菌落组成提示接种菌量过低，应重复试验。用游标卡尺或直尺测量细菌生长完全抑制区域的最接近整数毫米的直径，包括纸片直径。测量装置放在平板背面测量，平板上方几英寸处用反射光照射，背景黑色、无反光。对于葡萄球菌属与利奈唑胺、肠球菌属与万古霉素，应以透射光阅读纸片法试验抑菌圈直径。

抑菌圈为无肉眼可见细菌生长的区域。测定葡萄球菌或肠球菌的药敏试验时，在苯唑西林纸片(用于葡萄球菌属)或万古霉素纸片(用于肠球菌属)周围有任何可见的生长(包括针尖样菌落云雾状生长)都提示存在耐药可能。对于其他细菌，在一个清晰的抑菌圈内生长有散在的菌落，表明可能存在混合培养物，应重新传代、重新鉴定及重复试验。不过在抑菌区域内出现菌落也可能提示有高频率选择性突变菌株，预示其对抗菌药物耐药(如肠杆菌属对青霉素类和头孢菌素类)。而在测试磷霉素时，抑菌圈内常出现的这种小菌落，EUCAST指南要求在量取抑菌圈直径时忽略内部的菌落，但CLSI指南认为不应忽略[3-4]。对于变形杆菌，如果在抑菌圈内出现薄膜状云雾状生长，抑菌圈应测量到密集生长的边缘而忽略薄膜状云雾状生长。对于甲氧苄啶、磺胺类药物及两者复合制剂，培养基中的拮抗剂可能会允许出现一些小量生长；因此，测量直径应测明显的边际，轻微生长(20%或更少)可以忽略。

一旦确定了一个抑菌圈直径，下一步就是使用临床相关折点，将其分类为敏感、中介、剂量依赖敏感、耐药或非敏感(表73-1)。抑菌圈直径折点可在FDA网站[17]、CLSI M100标准[3]、CLSI网站M100文件[18]或EUCAST网站[4]查找。

一些自动化直径大小阅读仪附带电脑程序可根据选定抗菌药物和细菌分离株的线性回归方程将抑菌圈直径大小推算为MIC[30-32](第74章)。

(七)优点与缺点

纸片扩散法有以下几个优点：①操作技术简单，可重复性好；②试剂相对较便宜；③不需要任何特殊设备；④受试抗菌药物的选择较灵活；⑤可用于耐药性检测(第75章)。纸片扩散法的主要局限是已经标准化的微生物谱，如未在CLSI或EUCAST文件纸片扩散法中列出的细菌或者CLSI文件中的少见菌及苛养菌，尚未有足够的研究以制定可靠的解释标准[2-4]。同样值得格外注意的是，对于嗜麦芽窄食单胞菌和洋葱伯克霍尔德菌，仅部分药物可用纸片扩散试验[3-4]。纸片试验不能充分检测万古霉素中介的金黄色葡萄球菌[2,4,33-34]，不再推荐用于检测万古霉素和葡萄球菌；也不适用于检测葡萄球菌及肠球菌对达托霉素的耐药性[35-36]。由于难以检测异质性耐药，不推荐苯唑西林纸片检测葡萄球菌。然而，除假中间葡萄球菌和施氏葡萄球菌外[37]，推荐头孢西丁纸片用于可靠地检测葡萄球菌属对苯唑西林的耐药性。测试万古霉素和肠球菌属时必须注意，因为常发现抑菌圈直径处于中介分类的菌株，经肉汤稀释法确认为耐药。所以，当测试万古霉素和肠球菌属时，中介者应以MIC法复核。不推荐纸片扩散法检测革兰阴性杆菌对多黏菌素的耐药性[2-4]。纸片扩散敏感性试验的另一个潜在缺点是只提供一个定性的结果，而在某些情况下，可能需要定量的结果来显示敏感程度(MIC)(如青霉素和头孢菌素对肺炎链球菌和某些草绿色链球菌的敏感性)(第76章)。当治疗选择有限时，报告MIC值可进行PK调整以应对多重耐药革兰阴性病原菌的治疗[38]。

六、纸片扩散法质量控制

如之前本章节“稀释法质量控制”描述的那样，质量控制的目的是为了评估试验过程的精确度和准确度、监控试剂性能及实验者的操作能力。

(一)菌株选择

除外金黄色葡萄球菌,CLSI 和 EUCAST 关于纸片扩散法测试非苛养菌推荐的质控菌株是一样的,列于前面的“稀释法质量控制”章节。CLSI 要求使用金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 作为纸片扩散法质控菌株,而 EUCAST 要求使用金黄色葡萄球菌 ATCC 29213[3-4,39]。粪肠球菌 ATCC 29212 用于确保 MHA 中甲氧苄啶或磺胺类药物抑制剂的含量不超过可接受的限制范围,也可以用来做含有高浓度庆大霉素或链霉素药敏纸片的质控(第 75 章)。

质控菌株应从可靠来源获得,菌种保存的方式应能保证其生存能力,而且使其发生选择性耐药的概率最小[2,4,39]。参考前面“稀释法质量控制”章节关于维护和保存菌种程序的描述。如果出现无法解释的结果表明原菌种的固有敏感性发生了改变,应重新转种以获得新的菌种。

(二)抑菌圈直径范围

用于监测纸片扩散法的参考菌株的抑菌圈直径范围更新频繁且每年出版,因此,实验人员应参考最新版 CLSI M100 文件和 EUCAST 网站获取相关信息[3-4]。

(三)试验频率

每个新批次或货次的 MHA 在用于临床样本前必须用上述所列相关参考菌株测试,需在新货次抗菌药物纸片使用前或同时进行质量控制。培养基的改变可能对某些抗菌药物有重要影响,可作为培养基潜在问题的指示剂。如氨基糖苷类对培养基中二价阳离子的变化非常敏感,锰离子的变化可能会影响替加环素,甲氧苄啶-磺胺甲噁唑可反映胸腺嘧啶含量问题,而红霉素对不可接受的 pH 非常敏感[2,4]。

参考前面“稀释法质量控制”章节关于质控测试频率,同样适用于纸片扩散法。亦可参考 CLSI M02 文件关于“非可识别错误导致的失控”内容。

(四)特殊纸片试验

检测抗菌药物耐药特殊表型的方法,包括纸片扩散法的特殊应用,细节描述参考第 75 章。这些特殊的纸片扩散法试验用于检测:①金黄色葡萄球菌和凝固酶阴性葡萄球菌 *mecA* 介导的苯唑西林耐药;②克林霉素诱导耐药;③肠球菌高水平氨基糖苷耐药;④万古霉素耐药;⑤利奈唑胺耐药;⑥莫匹罗星耐药;⑦革兰阴性菌中存在的各种β内酰胺酶的表型筛选[2-4,40-41]。

七、抗菌药物敏感性试验常见错误来源

抗菌药物敏感性试验的误差可能与检测系统及其组成有关,也可能与操作步骤有关,有些与特定菌种-药物组合有关,也有些和最终报告相关[42-44]。下文所讨论的是临床微生物学实验室最常见的误差原因。

药敏试验系统的各环节均可能发生误差。首先,系统自身在检测某些特定微生物时可能存在局限性。例如,纸片扩散法只适用于生长速率一致的快速生长细菌(CLSI 和 EUCAST 已建立并公布了这些病原菌的解释标准)。其次,培养基成分或性能不达标也是误差产生的原因。培养基的 pH 值和离子浓度是影响基于琼脂和肉汤的检测系统结果的主要原因,MHA 和肉汤的 pH 应为 7.2～7.4,钙离子和镁离子浓度应达到 CLSI 和 EUCAST 规定要求才能保证结果的可靠性[1,4]。用于琼脂稀释法的 MH 琼脂厚度应在 3～4 mm,而纸片扩散法应该为 4 mm[1-2,4]。再次,检测系统各环节(含药纸片、琼脂平板、药敏板条)应恰当保存,超出有效期后不应再使用。

敏感性试验操作包含接种物制备、培养(条件和时间)、解释终点和质量控制等环节,如果未按照标准程序进行也会产生误差。接种物必须来自纯培养物,含有足够浓度的细菌。所有药敏试验终点均应该按照 CLSI 和 EUCAST 文件出版的指南进行准确判读[1-2,4]。如果由仪器进行结果判读,应定期对仪器性能和可靠性进行监测和校准。而且,所有药敏试验系统应定期使用适当的标准菌株进行检测,出现任何问题,必须彻底查找原因,采取纠正措施并完整记录。

有些药物与表面结合,尤其是药敏试验所用的塑料,对于部分药物(奥利万星、特拉万星和达巴万星)加入吐温 80 可以解决这一问题。对于黏菌素试验,目前不推荐吐温。随着黏菌素使用增加及其耐药性的出现,对于药敏试验的需求亦上

升。然而，主要由于黏菌素黏附于塑料以及在琼脂中的扩散性差，黏菌素敏感性试验仍是个挑战。虽然目前CLSI和EUCAST推荐肉汤微量稀释法测试，但有一研究四种黏菌素MIC方法（琼脂稀释、肉汤宏量稀释、肉汤微量稀释和梯度条）证明，肉汤微量稀释法所得MIC存在显著可变性，认为能获得最佳重复性的是琼脂稀释法[45]。近期另一研究显示，黏菌素与聚乙烯结合明显而与聚丙烯的结合少[46]。

由于体外结果和其体内活性并不一定相关，检测某些特定微生物-抗菌药物时可能会产生误导的结果。如检测沙门菌属和志贺菌属菌种对氨基糖苷类、窄谱头孢菌素的敏感性；葡萄球菌对除青霉素、苯唑西林、头孢西丁和头孢洛林以外的β内酰胺类的敏感性；肠球菌对头孢菌素、氨基糖苷类（检测高水平耐药的浓度除外）、克林霉素和甲氧苄啶-磺胺甲噁唑的敏感性，以及李斯特菌对头孢菌素的敏感性[1-4]。因此，不应报告以上微生物-药物组合的药敏试验结果。其他与报告相关的误差包括采用手工记录和报告系统的实验室可能会发生抄录错误，使用自动化药敏系统的实验室在数据和医院的LIS/HIS进行连接交换时的传输错误。

某些特定的细菌对一些常用抗菌药物的耐药性是可以预测的。如肠杆菌科中的某些属，包括克雷伯菌属、枸橼酸杆菌属和肠杆菌属细菌对氨苄西林耐药[3]。同样，嗜麦芽窄食单胞菌对碳青霉烯类药物耐药，铜绿假单胞菌对甲氧苄啶-磺胺甲噁唑耐药[3]。如果以上任何细菌和抗菌药物组合出现敏感结果提示抗菌药物敏感性试验或细菌鉴定出现错误。受试药物对某种微生物天然耐药的结果，不论MIC结果如何均应报告为耐药。参考M100“天然耐药表”[3]。

八、问题菌种及耐药机制

本章描述的稀释法和扩散法都是经过国家专业组织机构和诊断设备厂商的仔细研究和标准化后发展起来的。尽管如此，仍有一些微生物的检测方法未能标准化（如棒杆菌和一些苛养菌的纸片扩散法），亦有一些标准试验检测结果不可靠（如嗜麦芽窄食单胞菌和洋葱伯克霍尔德菌对某些药物的纸片扩散试验）。

检测存在可诱导性耐药菌株的时候可能也会存在问题（如葡萄球菌和部分链球菌的诱导型克林霉素耐药，一些肠球菌中的*Van B*型耐药及一些革兰阴性菌中的AmpC型β内酰胺酶）。与此类似，当某些耐药机制在标准接种和检测条件下仅有轻微表型表达时往往也引起争议[如一些肠杆菌科细菌超广谱β内酰胺酶（ESBL）或碳青霉烯酶表达][3-4]。在本书第75章中列出了检测以上耐药机制的特殊方法。如今ESBLs和碳青霉烯酶检测对临床治疗的必要性仍存争议。例如，CLSI根据PK/PD数据和常规给药剂量对头孢菌素、氨曲南和碳青霉烯类药物的解释标准进行了修正，这样选择治疗方案就不需要再进行ESBLs和碳青霉烯酶的确证试验[3]。一般来说，与导致感染病原菌的耐药基因是否存在相比，MIC值或耐药机制的表型表达往往更能有效预测个体患者的治疗预后。但检测耐药机制（特别是质粒介导的）对流行病学调查和院感控制仍有必要。

关于选择抗菌药物敏感性试验的检测方法或系统，何种准确度是可接受的，目前并无统一标准[47-48]。但在国际共识的努力下提出了可接受性能的常规评价指南（基本一致率和分类一致率）[49]。然而仍需注意新的耐药机制或重要治疗药物敏感性的下降随时可能出现，并给药敏试验带来挑战（如肠杆菌科细菌中碳青霉烯酶介导耐药的出现）[50]。因此，药敏试验方法必须与时俱进以应对不断出现的新挑战。

九、特定敏感性方法的优先选择

经室间和室内重复性验证MIC法和纸片扩散法后，建立了这些方法的解释分类。由于纸片扩散数据的解释分类是基于MIC最佳相关性而建立，绝大多数情况下，一种敏感性试验方法并不优于其他方法。然而，对于某些特殊情况，此时某种方法可能是优先选择。抗菌药物如达托霉素、达巴万星、多黏菌素B和黏菌素在琼脂中扩散不佳，因此绝大多数情况下对于这些药物纸片扩散法并不是一种准确的方法，而要求MIC法[2,4,51-52]。MIC法亦推荐用于测定葡萄球菌属对万古霉素的敏感性，因为万古霉素纸片扩散法并不能准确区分万古霉素中介和万古霉素敏感葡萄球菌属[53]。测试肺炎链球菌对青霉素、某些头

孢菌素和碳青霉烯类时，也需用 MIC 法[54]。某些细菌，来自好的对照研究的纸片扩散法数据较少或无，因此，大多数关注药物解释标准的建立也不可行(如嗜麦芽窄食单胞菌、芽胞杆菌属、棒杆菌属、乳酸杆菌属、明串珠菌属)。有些例子提示 MIC 升高但仍敏感的信息是有帮助的，尤其是对于流行病学目的。比如，肠杆菌科细菌分离株对氟喹诺酮类的 MIC 显示升高但仍处于敏感分类，可能存在第一步氟喹诺酮类突变(*gyrA* 突变)或可能的质粒介导氟喹诺酮类耐药机制[55]。类似地，一株对头孢菌素的 MIC 升高但以旧折点(2010 年前)判断仍处于敏感范围的肠杆菌科细菌，可能提示产 ESBL。随着 CLSI 和 EUCAST 对肠杆菌科细菌头孢菌素折点的重新修订，对于个体患者的治疗不再推荐进行 ESBL 的检测，但产 ESBL 对于流行病学和感染控制目的仍是有用的信息[3-4]。当治疗由一株多重耐药菌株引起的一种感染时，可能出现仅有一种抗菌药物敏感，临床医生可考虑通过一个改变的剂量、一种不同的管理方式使用中介甚至是耐药结果的药物，以优化感染部位的药物浓度，或尝试药物联合达到治疗目的[56]。一个 MIC 结果与药物具体 PK/PD 数据的结合，可能有助于指导治疗。

十、国际上折点的差异

近些年，EUCAST、CLSI 和 FDA 关于折点制定数据集和方法的建立已逐步达成共识。上述三个组织均认为在选择临床相关折点时，应主要考虑基于 MIC 数据的微生物学、药效学-药动学和临床暴露-反应关联及临床预后。另外，EUCAST 和 CLSI 已经开发了建立流行病学(野生型)界值(EUCAST 称 Ecoffs，而 CLSI 称 ECVs)的方法[4,9,57]。然而，即使在折点本身方面已经逐步趋于一致，由于各种原因仍存在脱离于方法学外的一些不同的折点，如不同的纸片种类和试验培养基(第 71 章)。建立折点的临床相关数据、数学模型和分析过程要求的共识需不断往前推进。当建立折点方法的变得更加国际化标准化时，折点趋向于一致性是完全可能的。

十一、抗菌药物敏感性试验的未来

抗菌药物敏感性试验是抗菌治疗的基石。用简单、可重复的体外试验来预测体内反应的能力，极大改善了患者的治疗水平。本章描述的稀释法和纸片法，虽然自发展以来有了很大的改进，但并不完美。一些组织如 CLSI 和 EUCAST 持续说明或修改方法以提升重复性和临床相关性。敏感性试验正变得越来越快，提升了其在患者早期治疗过程中的临床影响潜力。替代方法包括表型和基因型方法，正处于开发中，期待能改变抗菌药物选择、剂量和监测的方法。全基因组测序和基因表达的测试(如 mRNA 定量)可能成为未来药敏试验的基石(第 74 章和第 75 章)。除少数外，本章所描述的参考标准肉汤微量稀释法认为是“金标准”。随着新方法和精准医学技术的出现，抗菌药物敏感性试验的前景将多点开花，以持续改善患者健康。

参考文献请扫二维码查阅

第74章　抗菌药物敏感试验检测系统

JAMES A. KARLOWSKY，SANDRA S. RICHTER

（胡云建　译；伍勇、俞云松　审校）

临床重要分离菌的抗菌药物敏感性试验（antimicrobial susceptibility testing，AST）是临床微生物实验室的重要功能之一。为了解决由检测量增加带来的工作量增加的问题和提高检测的周转时间，20 世纪 80 年代，临床微生物学实验室开始使用商品化的 AST 检测系统，自 20 世纪 90 年代，这些系统广泛用于大多数实验室[1]。商用 AST 系统可以是自动化、半自动或手工的。目前，在样本量较小的实验室，一般使用手工和半自动化的微量肉汤稀释法检测系统，而在样本量较大的实验室则通常使用全自动微量肉汤稀释法的检测系统。大多数 AST 检测系统同时也能鉴定病原菌，详见第 5 章。目前在美国市场上只有一种采用纸片扩散法检测的半自动化系统在销售；而在其他国家，有更多的检测系统在使用。AST 检测系统还包括可以与实验室信息系统（laboratory information system，LIS）兼容的数据管理软件、各种不同水平的专家系统和流行病学分析软件[2]。

美国 FDA 对美国市场上的 AST 检测系统进行监督管理。AST 检测系统可归为Ⅱ类医疗器械（受一般控制），上市前需要递交 510(k)方案以获得 FDA 核准[3-4]。自动化的短时间孵育（<16 h）的 AST 检测系统需额外的特殊监管[4]。递交的 510(k)方案必须证明该设备和美国市场上的其他设备性能大体相同。FDA[4]建议 AST 检测系统和临床和实验室标准化协会（CLSI）推荐的参考方法[5-6]进行多中心的比对。每一个申请许可的细菌属或种需要测试该属或该种至少 100 个未经选择的临床分离株[4]。对每一种药物/菌种组合，可接受的性能指标包括：分类一致性（categorical agreement，即按 FDA 的折点判断，两法的敏感、中介、耐药相同）应大于 89.9%，基本一致性（essential agreement（即 MIC 结果在参考方法结果的一个稀释倍数值内）大于 89.9%，极重大错误（very major errors，VME）应≤1.5%（VME：把耐药的菌株做成敏感株），重大错误（major errors，ME）应≤3%（ME：把敏感的菌株做成耐药株）[4]。对于不符合上述标准的药物或菌种组合都应在使用说明书上列出并限制使用，同时列出备选方案。说明书的局限性声明还应包括下列情况：评估的耐药株数量不够、重复性不可接受（<95%），或一个菌群“不生长”率增高（>10%）[4]。由于不同检测系统间存在很大差异，因此，应当查阅当前的单个仪器/检测板说明书，以了解特定的药物或菌种组合的局限性，随着时间的推移，更新有时会频繁发生，这点非常重要。

当药品说明书中列出某药对特定微生物的临床疗效未被证明时，不鼓励实验室报告该抗菌药物的 AST 结果[4]。当制造商评估 AST 结果时，应使用 FDA 的解释标准[4]。当 FDA 解释标准发生改变时，制造商必须进行一个比对研究，如果新的折点影响仪器的性能，还需要提交一个新的 510(k)方案[7]。正如临床实验室期望的那样，现有的 FDA 解释标准通常是随 CLSI 的解释标准的变化而变化。如果完成了适当的验证，实验室可以使用新的解释标准报告结果，而不是那些原来在 AST 仪器上的规定[8]。当前 FDA 相关规定和已批准的设备列表参见网页：http://www.fda.gov/Medical Devices/Device Regulation and Guidance.

目前，从 FDA 批准一种抗菌药物用于临床到 FDA 批准商用 AST 设备检测该抗菌药物的敏感性之间存在显著延迟，有时长达 5 年。在对较老的抗菌药物修订折点发布后，再到 FDA 批准对商业 AST 检测系统使用这些折点的间隔时间甚至

有更长的延迟(3～6 年)。FDA 最近制定了指导草案,以帮助制药公司和诊断仪器制造商加快这一过程(抗菌药物和抗菌药物敏感性测试设备的协调开发:工业和食品药品管理局工作人员的指导草案;2016 年 9 月 21 日发布的文件)[9]。美国政府最近还通过了《21 世纪治疗法案》(21st Century Cures Act),其中包括一项从药品标签中去除折点的条款,并可允许 FDA 批准临床使用的商用 AST 系统对未在临床使用还在做人体实验的抗菌药物来对病原菌进行评估。此外,美国疾病控制与预防中心(CDC)认识到需要提高实验室检测较新的抗菌药物敏感性的能力,最近建立了抗菌药物耐药性检测的网络实验室,这是一个由区域组成的网络实验室,其功能包括提高对新出现的耐药性的检出能力,以及对新近可用抗菌药物的耐药性的检出能力。

本章主要介绍目前在美国使用的商业敏感性试验检测系统。微量肉汤稀释法 AST 检测系统的四家公司为:生物梅里埃公司(bioMérieux, Durham, NC; http://www.biomerieux-usa.com),贝克曼库尔特公司(Brea, CA; http://www.beckmancoulter.com),BD 公司(Becton Dickinson Diagnostics, Sparks, MD; http://www.bd.com)和赛默飞世尔科技公司(Lenexa, KS; http://www.thermoscientific.com)。BIOMIC V3 系统,为 FDA 核准的读取纸片抑菌环和微量肉汤稀释板孔的仪器,其制造商为 Giles Scientific (Santa Barbara, CA; http://www.biomic.com)。Accelerate Pheno 系统(Accelerate Diagnostics, Tucson, AZ; http://acceleratediagnostics.com)可对 14 种直接来自阳性血培养液的病原菌提供快速 AST 结果。读者应该意识到,药物敏感性试验检测系统会不断改进以应对新技术和新问题及新的耐药表型的出现。

一、人工浓度梯度扩散法

Etest (生物梅里埃),M. I. C. Evaluator (Oxoid, Thermo Scientific)和 Liofilchem MIC 测试条(Liofilchem S. r. l., Roseto, Italy)是一种用于定量 AST 的商业方法,它将预先形成的抗菌梯度应用于塑料(Etest, M. I. C. Evaluator)或纸(Liofilchem MIC 测试条)的一侧,使抗菌药物扩散到琼脂培养基中。该试验的操作方式类似于纸片扩散法,将测试菌株配制成 0.5 McFarland 标准悬浮液,然后用棉签涂在琼脂表面。孵育后,直接从测试条上的刻度读取 MIC,该刻度位于病原菌生长抑制圈与条带相交的位置[1]。在合适的圆形琼脂平板表面可以放一条或几条,每条含有不同的抗菌药物,或者在大的矩形平板上它们可以放在相反的方向上。本方法测定的 MICs 值与标准的肉汤或琼脂稀释法测定的 MICs 值基本一致[10-12]。Etest, M. I. C. Evaluator 和 Liofilchem 条即有纸片扩散法的简单性和灵活性,又可以检测 MIC 值,一个直径为 150 mm 的圆形琼脂平板上最多可测定 5 种抗菌药物。然而,琼脂梯度扩散法远比用于纸片扩散法更昂贵。这些方法的优点包括:操作步骤简单;可获得不常用于检测的抗菌药物的 MIC 值及按照包装说明书上的说明,将试条贴在专用的培养基上,来检测苛氧菌或厌氧菌的药物敏感性。

二、判读纸片扩散法试验结果的半自动分析仪

纸片扩散法抗菌药物敏感性试验的优点包括操作简单、结果可靠、低成本和可灵活选择测试的抗菌药物种类[1]。可用于判读和解释纸片抑菌圈结果的半自动仪见表 74-1。对于所有的系统,琼脂板经孵育后手动放入分析仪,之后进行图像采集和测量抑菌圈。尽管成像技术快速发展,但是当看到琼脂板内有微弱生长或抑菌圈内有微小菌落时,建议评估一下是否需要手工调整直径的测量值。数据处理软件决定结果的判读(敏感、中介、耐药),并与 LIS 系统连接。虽然用线性回归的统计学方法测量抑菌圈可以得到 MIC 值,但是某些抗菌药物的 MIC 值的有效性受到质疑[13]。专家系统和流行病学分析软件都适合于上述系统。这些仪器的主要优点是:①减少区域测量的误差(相对于不同技术员使用卡尺或直尺的情况);②减少抄写的错误;③节省工作量;④提高数据处理能力;⑤专家系统复查以确保报告结果和已知耐药表型保持一致。总的来说,这些仪器可提供重复性好和准确的结果。在系统评估时,生长缓慢的细菌是造成这种差异的主要原因[14-16]。

表 74-1　手工和半自动药敏试验仪器概述

类型	特征	制造商[a]	检测系统	参考文献
半自动纸片扩散法	半自动辅助判读、记录抑菌环，并解释结果；使用专家系统和流行病学软件进行数据管理	Giles Scientific	BIOMIC V3	14，155
		i2a	Sirscan 2000[b]	15
		Oxoid	Aura Image[b]	16,156
		Mast	Mastacan Elite[b]	157
		Bio-Rad	ADAGIO[b]	158
手工微量肉汤稀释法	人工目视观察稀释结果、记录和报告	Beckman Coulter	MicroScan data management（LabPro Information Manager）	
		Thermo Scientific	Sensititre Vizion	
半自动微量肉汤稀释法	当板或条完成孵育后，用自动化设备判读稀释结果并报告	Beckman Coulter	MicroScan AutoSCAN-4	
		Thermo Scientific	Sensititre OptiRead	
		bioMérieux	Mini API[b]	
		Giles Scientific	BIOMIC V3	159

注：[a]Bio-Rad. Hercules，CA，http://bio-rad.com i2a，法国蒙彼利埃；Mast. 英国布特尔，http://www.mastascan.com；Oxoid，英国贝辛斯托克，http://www.oxoid.com. 见其他制造商的原文；[b] 目前在美国不可用

三、手工微量肉汤稀释法检测系统

表 74-1 中列出的手工微量肉汤稀释法检测系统，方便直接读取和记录 MIC 值。检测板是经冷冻（Thermo Scientific 定制板）或者脱水（MicroScan and Sensititre 微孔板）处理。对无水的检测板加液并接种的设备包括：手工 RENOK 设备（MicroScan）、由微处理器控制 Sensititre 自动化接种转运系统和 Sensititre 多通道电子移液管。经过脱机孵育后，MicroScan 数据处理系统（LabPro）可显示检测板格式化的图像，用于直接在电脑上记录手工结果。Sensititre Vizion 系统在电脑屏幕上显示一个 96 孔药敏板放大的图像，它带有叠加模板，可指导终点判断，并把结果传输到数据管理系统（SWIN，Sensititre Windows software）进行专家分析。SWIN 数据管理系统不只是用在 Sensititre Vizion 仪器上，也适用于记录手工结果。

大多数厂家提供标准的革兰阳性菌、革兰阴性菌、链球菌属药敏检测板，以及产超广谱 β-内酰胺酶（ESBLs）确认检测板。Thermo Scientific 还提供了 FDA 核准的 Sensititre 药敏检测板，以及“仅用于科研”的药敏检测板，可以人工或者使用 Vizion 系统读取结果。

四、半自动微量肉汤稀释法检测系统

在表 74-1 中列出的半自动微量肉汤稀释法检测系统在线下培养后利用自动化装置读取药敏和鉴定的试验结果。此结果传送到一个数据管理系统，它可能包括和全自动化系统相同的专家分析系统软件以对结果进行分析。更多关于 MicroScan 和 Sensititre 检测板的信息见自动化系统部分。

五、自动化微量肉汤稀释法检测系统

自动化 AST 检测系统只要将检测板放入培养和读取终点的仪器，不需要更多的人工干预即可获取结果。表 74-2 介绍了目前在美国应用的自动化检测系统。其中 VITEK、MicroScan WalkAway 和 Phoenix 系统在短时间孵育后（<16 h）便可获得 AST 结果；但目前使用的 Sensititre ARIS 检测板和某些 MicroScan WalkAway 检测板还需要过夜孵育。有关了解适合每个系统检测的当前临床应用的抗菌药物种类，可咨询生产厂商。

表 74-2 自动微量肉汤稀释法药敏试验仪器概述[a]

制造商	检测系统	样本量	检测板	检测卡的类型(数量)	仪器特征	软件
Becton Dickinson	BD Phoenix	50 或 100	鉴定和药敏在同一板上：药敏 85 孔/鉴定 51 孔或 136 孔药敏板(高危菌)	革兰阳性菌板(6) 革兰阴性菌板(5) 链球菌板(1) 高危的革兰阳性菌板(1)	自动重力自加样接种和 AST 稀释。AST 报 MIC 值，单独的药敏板，也可与鉴定底物组成药敏/鉴定复合板。系统每 20 min 连续检测，比浊法和氧化还原指示剂法读数。结果为全范围的 MIC 值	BDXper BD EpiCenter Advanced
bioMérieux	VITEK 2, VITEK 2 XL	60，120	64 孔的试卡	革兰阳性菌板(6) 革兰阴性菌板(27) 肺炎链球菌板(1) 酵母菌板(1)	全自动化的 AST 稀释、填充/密封卡。每隔 15 min，对浊度读数，通过 1～6 个不同稀释度的抗菌剂生长情况推算其 MIC 值	AES Myla Observa BIOART
	VITEK 2 Compact	15，30，60	64 孔的试卡	见 VITEK 2	与VITEK 2 相比，自动化程度略低，但更经济实惠	见 VITEK 2
Beckman Coulter	MicroScan WalkAway plus	40 或 96	标准 96 孔微孔板	过夜革兰阳性菌板(10) 过夜革兰阴性菌板(20) ESBLs 确认板(1) 链球菌板(1)	药敏测试可以报告全范围的 MIC 值或折点的 MIC 值；药敏/鉴定复合板条包括鉴定的底物。MIC 读数；过夜，比浊法	LabPro Information Manager LabPro $Alert_{EX}$ LabPro Connet LabPro MBT
Thermo Scientific	Sensititre ARIS 2X	64	标准 96 孔微孔板	革兰阳性菌板(3) 革兰阴性菌板(8) 链球菌板(2) ESBLs 板(1) 酵母菌板(1)	自动孵育后进行荧光判读得到全范围的 MIC 值。可用于革兰阴性菌、革兰阳性菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、真菌、RUO(分枝杆菌、厌氧菌、空肠弯曲菌)的检测以及用户定做的板(冷冻干粉)	SWIN 流行病学统计模块

注：[a] RUO. 仅供研究使用

(一)VITEK 系统

第一台 VITEK 仪器，VITEK 1（VITEK Legacy)，检测原理是通过比较细菌在对照孔和含抗菌药物孔的生长曲线分析快速获得 MIC 结果，并于 20 世纪 80 年代引入临床实验室。2000 年 FDA 批准上市了自动化程度更高的 VITEK 2 后，VITEK 1 被淘汰。AST 药敏卡是塑料 64 孔板，包含 14～24 种抗菌药物的 1～6 个不同浓度。一般革兰阳性和革兰阴性细菌的鉴定板可与相应的 AST 板同时进行检测。智能载卡架包括条码扫描、微处理器基本单元和可放 15 张检测板的托架。人工准备接种的菌悬液后，将检测板放入托架上。托架的内存芯片会将扫描信息转移至孵育读数单元。大型实验室的工作流程可以通过放置在多个位置的智能载卡架进行优化。卡架放入 VITEK 2 装载仓，卡架可以自动移动并通过条形码阅读站，AST 稀释液的制备站、接种检测板和卡片密封。运输系统把检测板放入容量为 60 张板卡可旋转的孵育仓内。一个更大的 VITEK 2 仪器，VITEK 2XL，其容量为 120 张板。每一张板卡每隔 15 min 被移到光学读数站测量一个与生长成比例的透光率。用线性回归分析方法计算出的 MIC，一般在 4～18 h 获得结果。高级专家系统(AES)在以后的部分进行讨论。

2005 年推出的 VITEK 2 Compact 更适合小型实验室使用，与 VITEK2 系统使用相同的检测板。该仪器有 3 种不同的型号，可容纳 15、30 或 60 张检测板。VITEK 2 Compact 的自动化程度没有 VITEK 2 高，但比 VITEK 2 更实惠。人工

准备初始接种菌悬液和稀释液。检测板先放置在真空单元(仪器的左侧)进行填充，然后手动转移到仪器的右侧，板自动切割密封，随后自动转移到的孵育—读数单元。

VITEK 2 数据管理系统(Observa)采用 Windows 系统，可用于整合 VITEK 2 和生物梅里埃血培养仪的数据生成流行病学报告。最近生物梅里埃又加入 Myla 中间软件，可与 LIS 连接管理多台生物梅里埃的仪器，对检测结果和质量指标进行综合监测。Myla 软件的功能包括发送质谱鉴定仪 VITEK MS 的鉴定结果到 VITEK 2 药敏结果中，对药敏试验结果进行远程审核，输入手工药敏试验结果，生成敏感谱报告。VITEK 2 报告软件 BIOART (bioMerieux 高级报告工具)允许定制报告，减少了手动修改报告的麻烦。

(二)MicroScan WalkAway

在 20 世纪 80 年代末，MicroScan WalkAway 检测系统得到进一步发展，提供了隔夜孵育后根据浊度判读结果的传统 AST 板。所有 96 孔微量稀释检测板包括：① MIC 检测板(宽泛的抗生素稀释度)；②MIC 复合检测板(一些孔用于鉴定)，以及③折点复合检测板(抗菌药物非系列稀释浓度的板，只包括判读敏感、中介、耐药等几个有限浓度)。

第四代 WalkAway *plus* 系统包括一个孵育器—读数器单元、一个连接 LIS 系统的个人电脑和一个打印机。液位传感器为一定向发光二极管系统，而大容量储液槽缩短了所需的维护时间。两个型号仪器分别容纳 40 或者 96 块板条。快速接种系统(可用于传统过夜检测板)配合接种针可制备一个无需调整比浊且可稳定 4 h 的标准接种液。一个手动加液装置(RENOK)用于加液和接种板条。加湿孵育读数系统包括条码扫描器、旋转传送塔，机械臂用于将板条放置于中间的光度计或荧光计进行判读。数据管理系统(LabPro)用于解释结果，生成患者报告、存档数据等，并生产用户自定义的报告(如敏感谱、趋势分析和流行病学报告)。2002 年后，数据管理系统已经能够与含有大于 100 种规则的专家系统(LabPro Alert)相结合，这些专家规则支持用户自定义。LabPro 连接系统允许多台仪器和计算机连接到工作站。此外，LabPro MBT 软件将来自 Bruker 质谱系统的 ID 结果与来自 MicroScan WalkAway 系统的 AST 结果连接起来。

(三)BD Phoenix

BD Phoenix 检测系统 2001 年在欧洲，2004 年在美国投入使用。最新增加的模块 M50 仪器，具有 50 个测试板的容量，包括将一个模块整合在另一个单元上的能力。该仪器可同时承载最多 100 块检测板。聚苯乙烯材质的检测板包含 136 孔，可专用于 AST(例如，单独药敏板；大约 28 种抗菌药物及检测耐药标记物的孔，比如超广谱 β 内酰胺酶检测实验)，或 Combo 检测板分为 51 孔用于鉴定和 85 孔包含 14～22 种抗菌药物的 AST 部分，再加上耐药标记物检测实验。

2008 年引入 Phoenix AP 仪器是为了减少接种检测板的手动时间及使接种流程的规范化。为使工作效率最大化，在每位技术员的工作台，均放置带有条形码打印机的 EpiCenter 工作站。每个 ID 肉汤管贴上 EpiCenter 生成的标签，再使用菌悬液进行接种。5 个菌株一组的 ID 肉汤和对应的 AST 肉汤被放入 AP 仪器中的一个架子内进行自动标准化的操作，包括 ID 肉汤的接种、接种 AST 肉汤、并加入 AST 氧化还原指示剂。该架子然后转移到一个接种工作站，在那里手动把 ID 和(或) AST 肉汤倒入检测板的对应位置。检测板以塑料帽密封，放置在 Phoenix 仪器上。

Phoenix 分析仪每 20 min 读取一次检测板，通过氧化还原指示剂的颜色变化和浊度变化来确定细菌的生长。生长(代谢活动)引起氧化还原指示剂从蓝色变为粉色。抗菌药物浓度连续对倍稀释，检测系统通过对每一个孔判断“生长”或“未生长”而报告真正的 MIC 值，而不是计算出的 MIC 值。药敏结果在 6～16 h 内完成。

BD 专家系统应用 CLSI 或其他标准的规则来解释 AST 结果。结果可以在 Phoenix 仪器、BD EpiCenter 或实验室 LIS 系统显示。BD EpiCenter 是数据管理软件，可分析流行趋势和利用来自多个 BD 仪器(Phoenix、BACTEC 血培养仪、MGIT 960 及 Bruker 质谱仪)的信息生成报告。BD EpiCenter 的特征为：它包括一个双向 LIS 接口，可以创建用户特定的规则来分析 AST 结果。

(四)Sensititre ARIS 2X

Sensititre 于 1992 年在美国推出了 ARIS 系统(Automated Reading and Incubating System,自动读取和孵育系统),该系统提供过夜孵育的 AST 结果[17]。2004 年,Sensititre 推出了最早的 ARIS 2X 版本。Sensititre 的 ARIS 2X 仪器自动读数,同时检测 64 张板(标准的 96 孔微孔板),包括药敏 MIC 板或单独的鉴定板。在放置到仪器传送带之前,使用 Sensititre 的 AIM 自动接种系统或手持式多通道电子移液器进行接种检测板。2012 年,符合麦氏菌悬液的接种物移至 11 ml Sensititre 的 MH 肉汤管用于药敏板。用于检测非苛养的革兰阴性和革兰阳性菌及链球菌的 JustOne strips,菌液量从 10μl 增加到 30μl 以助于对细菌耐药亚群的检测。Sensititre 的 MycoTB 检测板采用微量肉汤稀释法的 MIC 检测模式检测临床分离的结核分枝杆菌对一线和二线抗结核药物耐药性,该方法报告结果的时间比作为参考方法的 1%间接琼脂比例法要早 1 周[18]。一个内置的条形码扫描仪识别板类型并分配适当的孵育时间。经过 16~24 h 孵育后,每一张 AST 检测卡被运到自动读数系统,系统自动对板进行终点的荧光强度的判读。数据管理软件(SWIN)提供专家系统分析的结果。配套的流行病学统计模块可为实验室提供完整的药敏谱报告。

(五)自动化检测系统的优点

自动化 AST 检测系统的优点包括:节省人力、重复性好、具备专家系统可对数据结果进行分析以及更快获得结果。一个关于 VITEK 2 和 Phoenix 系统的工作流程和性能评估报告显示,对于每株菌,Phoenix 上机准备时间(3 min)要比 VITEK 2(1.5 min)长,但在每月保养时间上,VITEK 2(63.2 min)要多于 Phoenix (21.2 min)[19]。新的 Phoenix AP 仪器可使每株菌的手工操作时间节约 50%,在对一批 14 株菌的操作中,它比 VITEK 2 工作流程减少了 11.5 s($P<0.001$)[20]。

产生 AST 结果的总体平均时间,相比于 VITEK 2 (8.4 ± 2 h),Phoenix (12.1 ± 2.7 h)需要时间较长($P<0.001$)[19]。Ligozzi 等报道,使用 VITEK 2 AST 系统获得结果,革兰阳性球菌需要的时间为 6~17 h,90%细菌结果如下:金黄色葡萄球菌 8 h;凝固酶阴性葡萄球菌 11 h;肠球菌 9 h;无乳链球菌 7 h;肺炎链球菌 9 h[21]。有限的数据显示快速的 AST 结果与经济和临床效益有关。Doern 等[22]报道快速的 AST 结果可以减少病死率和节约费用(可减少诊断试验和在重症监护中的天数)。Barenfanger 等[23]也证明:快速报告 AST 结果缩短住院时间和节省花费,这归因于早期调整抗菌药物治疗方案。Accelerate Pheno 系统提供的新技术可直接用阳性血液培养液做 AST,检测时间比在菌株上进行的测试要短。Accelerate 系统将在其他 AST 系统一节中进一步讨论。将来,AST 检测的时间可能最终会随着分子技术的应用而进一步减少。Rolain 等[24]采用实时定量 PCR 技术检测抗菌药物对细菌生长的影响,用较短的时间来获得结果(革兰阳性球菌 4 h,革兰阴性杆菌 2 h)。为了使分子技术应用于临床实验室,还需要更多的研究,同时应提高自动化程度和降低成本[24]。

实验室与临床医生和药师进行有效沟通,对实现快速检测的潜在优势非常必要[25]。通过和病历信息交联的软件包,我们可以加强与临床的交流,警示临床医生或药师在需要的时候,调整抗菌治疗方案。

(六)自动化检测系统的缺点

与手工方法相比,自动化检测系统的缺点包括:仪器和耗材高成本、固定抗菌药物种类的检测板、无法检测所有临床相关的病原菌和所用的抗菌药物、对异质性耐药分离株和某些耐药表型的检测存在问题[26-27]。此外,实验室必须对新配方的抗菌药物进行确认,对于 FDA 滞后于 CLSI 已更新折点的抗菌药物,必须使用附加的检测和报告方法。用于折点检测的微量肉汤微稀释板中包含的抗菌药物的数量和种类比用于全范围稀释检测的板中要多[28]。但是,对于缺乏折点的药敏板,通过质量控制程序来保证每种抗菌药物的适当浓度。有关 AST 系统对有问题的耐药表型的检测性能见下面的讨论。采用已过时的检测板或软件可能无法准确反映某系统当前的检测性能。如果评价仪器性能使那些难以检测的表型的挑战株(challenge strains),那么,与采用临床实验室常见分离株进行的研究相比,系统出现更高的错误率应该可以接受。

(七)自动化仪器检测耐药表型的能力

1. 万古霉素耐药肠球菌　多个研究已经证实自动化仪器在检测肠球菌低水平万古霉素耐药(VanB、VanC)存在问题[29]。一个 VITEK 2 的评估仅报告该仪器难以检测出 VanC2(铅黄肠球菌)菌株[30]。其他关于 VITEK 2 和 Phoenix 的研究报告称:它们能够准确检测出万古霉素耐药肠球菌,但是缺乏检测系统间比较的严谨研究[31-34]。FDA 限制 Phoenix 用户采用该仪器检测铅黄肠球菌和鹑鸡肠球菌对万古霉素的敏感性,此时应选用备选方法[32]。MicroScan 过夜培养后发现,它能检测出所有菌株,除了含有 VanC 的菌株外。对于后者,所有 AST 检测系统都难检测出来,因为它们的 MIC 为 4～16 μg/ml,跨越了敏感和中介范围[35]。

2. 高水平链霉素耐药肠球菌　MicroScan 采用过夜培养检测高水平链霉素耐药(high-level streptomycin resistance, HLSR)肠球菌初期出现的问题,后来通过肉汤重配方而得以解决[36]。一个 MicroScan 检测 HLSR 有较高的极重大错误率(VME)的研究报告认为:其原因[35]可能是没有按照推荐的时间 48 h 培养后再阅读结果,而是在过夜培养后就判读敏感。有关 VITEK 2 和 Phoenix 检测 HLSR 或高水平庆大霉素不同耐药株的独自的评估报告显示,VME 率为 0～5.2%,重大错误率(ME)为 0～7.3%[31-34]。

3. 利奈唑胺耐药肠球菌和葡萄球菌　由于利奈唑胺拖尾生长,因此检测时很难准确判读结果[37]。同时利奈唑胺耐药的菌株分离率低限制了厂商优化 AST 系统的检测能力。一个研究报告用 50 株肠球菌和 50 株葡萄球菌(包括 32 株对利奈唑胺不敏感株)来检测利奈唑胺的敏感性,与 CLSI 微量肉汤稀释法结果比较,MicroScan、VITEK 2、Phoenix 和 VITEK 的分类一致性分别为 96.0%、93.0%、89.6% 和 85.9%[38]。Brigante 等[31]检测 100 株肠球菌对利奈唑胺的敏感性,发现 Phoenix 与 Etest 结果相比,其分类一致性为 89.0%。与微量肉汤法和分子与表型结合的金标准比较,VITEK 2 GP70 药敏卡 27 株葡萄球菌和肠球菌的检测结果中,有 19%～30%(27 株中有 5～8 株)的利奈唑胺不敏感是高估的,而 MicroScan M29 药敏板有 4%～15% 的非敏感性(27 株中 1～4 株)是高估的[37]。MicroScan M29 药敏板有 7%～11%(27 个分离株中 2～3 个)的利奈唑胺假敏感的结果[37]。对利奈唑胺不敏感的革兰阳性菌株,应按 CLSI[8] 所述,推荐使用纸片扩散法或 MIC 参考方法进行验证。

4. 青霉素耐药葡萄球菌　如果葡萄球菌菌株对青霉素的 MIC≤0.12 μg/ml,应该对其进行可诱导的 β-内酰胺酶试验(凝固酶阴性葡萄球菌)或青霉素纸片扩散法抑菌圈边缘试验(金黄色葡萄球菌),且结果为阴性时,才能报告临床对青霉素敏感[8]。对于 197 株 VITEK 2 检测出 MIC≤0.12 μg/ml 的金黄色葡萄球菌,与参考方法 PCR 检测 *blaZ* 相比,表型方法(可诱导头孢硝噻酚)的敏感性为 39%,纸片扩散法抑菌圈边缘试验检测为 71%[39]。由于对青霉素敏感的葡萄球菌菌株分离率较低,使用表型的检测方法可能检测不出 β-内酰胺酶,因此在使用青霉素治疗严重感染之前,应对患者随后的分离株连续检测[8]或使用分子方法检测[39]。

5. 苯唑西林耐药葡萄球菌　当评估一个系统检测葡萄球菌对苯唑西林的耐药性时,绝大多数研究把 PCR 法检测 *mecA* 基因的方法作为金标准。多个研究已经表明自动化的检测系统对于甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(methicillin resistant *S. aureus*, MRSA)的检测具有满意的敏感性和特异性[21,32-33,40-41]。然而,常规采用苯唑西林试验可能检测不出异质性耐药株[42-43]。MicroScan、Phoenix 和 VITEK 2 检测系统的制造商已经通过在检测盘中增加头孢西丁来改进了对 MRSA 的检测[43-48]。至于甲氧西林耐药凝固酶阴性葡萄球菌(CoNS),MicroScan, Phoenix, 和 VITEK 2 检测系统评估显示,均具有极好的敏感性(92%～99.4%),较低的特异性(62%～96%)[21,33,49-54]。在 1999 年 CLSI 将 CoNS 苯唑西林的敏感折点改为≤0.25 μg/ml 以前,对苯唑西林假耐药的葡萄球菌其苯唑西林的 MIC 值常在 0.5～2.0 μg/ml,其结果应为敏感[55]。一些检测发生重大错误(ME)的路登葡萄球菌,根据 2005 年 CLSI 路登葡萄球和金黄色葡萄球菌使用相同的折点标准(≤2 μg/ml),它对苯唑西林的 MIC 值应报告敏感[49-50]。CoNS 对苯唑西林较低的折点可以准确的检测出绝大多数携带 *mecA* 基因的人葡萄球菌、溶血葡萄球菌、表皮葡萄球菌菌株,但对于

CoNS其他种，如腐生葡萄球菌，苯唑西林耐药性可能会被高估[55]。一个关于VITEK 2评估报告显示，测试卡中加入头孢西丁筛选孔，在CoNS中检测*mecA*基因介导的耐药性比苯唑西林检测具有更高的特异性[56]。

6. 糖肽类抗生素敏感性下降的葡萄球菌 最初的自动化AST检测系统不能可靠地检测出万古霉素耐药金黄色葡萄球菌，导致采用万古霉素琼脂筛选板作为暂时的替代方法，直到对检测系统进行优化后，才可以检测万古霉素耐药金黄色葡萄球菌[57-58]。一个关于四种商业AST系统对万古霉素中介的金黄色葡萄球菌的检测评估报告显示，敏感性为64%～100%；两个检测系统敏感性100%，但把敏感株误判为对万古霉素中介的金黄色葡萄球菌即错误分类，MicroScan为12%和Phoenix为24%[59]。文献还报道了在MRSA中出现了万古霉素MIC"漂移"主要取决于检测的方法和菌株的存储方法[60]。也有文献报道，自动化检测系统检测糖肽类敏感性下降的MRSA和CoNS不可靠[61-62]。当发现金黄色葡萄球菌对万古霉素的MIC≥8 μg/ml或CoNS对万古霉素的MIC≥32 μg/ml时，CLSI鼓励实验室用第二种方法确认这些对万古霉素不敏感的结果，并把它们送到参考实验室[8]。

7. 可诱导的克林霉素耐药 临床分离的葡萄球菌和β溶血链球菌，如果对大环内酯类抗生素耐药而对克林霉素中介或敏感时，需要采用CLSI规定的纸片扩散法和微量肉汤稀释法做诱导克林霉素耐药性的检测[8]。自动化AST检测用的纯菌悬液可以用来做纸片法D试验[63]。最近，FDA核准的诱导克林霉素耐药葡萄球菌试验已见于所有自动化检测系统(表74-2)。一个最近通过使用临床分离新鲜株进行克林霉素诱导耐药的对比试验报告发现：Phoenix(敏感性为100%；特异性99.6%)比VITEK 2(敏感性为91.1%；特异性99.8%)更敏感[64]。另一项研究发现，在克林霉素耐药性诱导检测中，使用VITEK 2的AST-P612药敏卡有假阴性结果，大约4株对红霉素不敏感菌中出现1株[65]，另一项研究报告了有20%的金黄色葡萄球菌在克林霉素诱导耐药性的检测中出现了VME[48]。相反，还有一项研究报告VITEK-2的AST-P610药敏卡检测结果与D试验和基因型试验结果100%相符[66]。

8. 链球菌属细菌耐药性 尽管链球菌属细菌孵育时间短，但通过对Phoenix和VITEK 2药敏测试卡进行评估证实：此2种检测系统都可获得可靠的结果[31,67-69]。VITEK 2的AST-ST01药敏卡及MicroScan和Sensititre过夜孵育的肺炎链球菌检测板都能够提供准确的药敏结果(除甲氧苄啶磺胺甲异噁唑药物外，主要原因是拖尾生长现象)[70-72]。但用这些商品化的AST系统检测新出现的耐药性往往不是首选的。例如，日本一项关于VITEK 2的研究，对于28株琼脂稀释法测定为青霉素敏感性降低的无乳链球菌，采用AST-P546药敏卡检测时，只能够检测出50%的菌株，这些罕见的无乳链球菌菌株可能误判为青霉素G敏感[73]。

9. 革兰阳性菌的其他耐药问题 使用MicroScan的测试板PC29，检测屎肠球菌、粪肠球菌和金黄色葡萄球菌对达托霉素的耐药性，发现假的不敏感率很高，但没有用Etest法或参考的微量肉汤稀释法进行确认[74]。随后使用药敏板PC29和PC33，检测报告已经证实，MicroScan系统对肠球菌属，尤其是屎肠球菌对达托霉素出现过高的假不敏感性[75-77]。这些和其他不常见的耐药表型，需要报告前进行确认[8]。另一种极端的假敏感性也会发生。使用VITEK 2的药敏卡AST-GP2，检测肠球菌属对达托霉素的耐药性，VME可达到33.3%[48]。据报道，使用VITEK 2的药敏卡AST-GP67检测临床分离的大多数粪肠球菌时也存在青霉素耐药过度，显示出青霉素耐药/氨苄西林敏感这个表型[78]。

10. 产ESBL肠杆菌科细菌 2010年，对于肠杆菌科细菌，CLSI M100修订了头孢菌素(头孢唑啉、头孢噻肟、头孢曲松、头孢唑肟和头孢他啶)和氨曲南的折点，常规不需要再做ESBL检测，除非要使用下列抗菌药物即头孢尼西、头孢哌酮、头孢孟多或拉氧头孢，其原因是目前未对它们的解释标准作更新的评估[8]。出于感染控制的目的，一些实验室可以继续检测ESBL。ESBL确认试验，典型的是测定克拉维酸对头孢他啶、头孢噻肟分解作用的抑制作用，表74-2中列出的所有的自动化系统均可使用。对大肠埃希菌和克雷伯菌属细菌的ESBLs检测的两个对照评估显示，VITEK 2的敏感性为74%～91%，Phoenix为92%～96%；特异性为81%～85%[79-80]。单一的AST系统

(VITEK 2 或 Phoenix) 对 ESBL 检测的评估报告显示,敏感性为 54%~100%,特异性为 96%~99.7%[81-86]。MicroScan 的 ESBL 测试板评估显示:敏感性为 88%~100%,特异性为 77%~98%[87-90]。MicroScan[90] 和 Phoenix[83,91] 检测系统都会把高产 K1 酶的产酸克雷伯菌报告成 ESBL 阳性(假阳性结果)。一个关于检测 ESBL 性能评估报告显示,对于收集的 137 株产 CTX-M 型大肠埃希菌,VITEK 2 只能检测出 68%[92]。VITEK 2 的药敏卡 GN-09 和 GN-25 检测 304 株 ESBL 阳性大肠埃希菌[93]对头孢吡肟的 MICs 时,按照 2017 CLSI 的 MIC 折点判断[8],已证实有较高的 VME (12%)出现,较低的分类一致性(55%)和基本一致性 (59%)。

11. 碳青霉烯类抗生素耐药性 当自动化 AST 检测系统应用 2009 年或更早的 CLSI MIC 结果解释指南时,研究发现它不能在肺炎克雷伯菌和其他肠杆菌科细菌中识别出新出现的碳青霉烯类抗菌药物的耐药性[82,94-96]。在自动化 AST 系统测试板中加入厄他培南后明显提高了产 KPC 酶肠杆菌科细菌的检出率,主要是在 CLSI 指南中,与美罗培南和亚胺培南相比,厄他培南具有相对较低的折点,而对碳青霉烯酶更敏感。随后的研究表明,这个问题在很大程度上通过 2010 年 CLSI 碳青霉烯类抗菌药物折点更新后得到纠正,同时与测试系统相关[95,97-99]。研究显示,VITEK 2 药敏卡 AST-GN28 对于产 KPC 肺炎克雷伯菌,其检测美罗培南的耐药性存在问题,VITEK 2 美罗培南孔已重新改进[100]。在确定鲍曼不动杆菌碳青霉烯类抗生素耐药性方面,Phoenix、MicroScan 和 VITEK 2 都存在问题[101-103]。

也已注意到在检测碳青霉烯类抗菌药物敏感性时出现假耐药的问题[104-105]。1996-1999 年,44 家美国医院实验室报道亚胺培南不敏感的 123 株肠杆菌科和 325 株铜绿假单胞菌,经 CDC 确认后正确率分别为 9% 和 74%[104]。对于这种过度检测碳青霉烯类抗菌药物耐药性缺乏明确的解释,作者建议实验室应使用另外一种 AST 方法确认碳青霉烯类不敏感的结果[104]。测试板中抗菌药物降解及操作错误可能是导致 AST 系统过度检测碳青霉烯类耐药的影响因素[104-105]。2012 年,bioMérieux 公司引入新的 FDA 注册的 AST 药敏卡(如 AST-GN29, ASTXN06)其用新配方的哌拉西林/他唑巴坦和亚胺培南,以及修改的软件来改善 VITEK 2 系统的性能,解决了许多之前报道的错误,尤其是检测肠杆菌科、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌和嗜麦芽窄食单胞菌对 β-内酰胺类抗菌药物的耐药性[106-107]。笔者鼓励读者向其他 AST 系统的制造商查询,以确定是否已经对这些系统进行了类似的改进,以解决碳青霉烯类抗菌药物耐药性检测的这些早期问题。

12. 革兰阴性菌其他耐药性 直接用临床分离的位于折点范围附近的铜绿假单胞菌株来比较自动化 AST 系统准确性的三个评估报告发现:亚胺培南、哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟、头孢他啶和氨曲南均出现了不可接受的错误率[108-110]。只用 VITEK 2 药敏卡检测 3 种抗菌药物(头孢吡肟、头孢噻肟、庆大霉素)对临床分离的铜绿假单胞菌的抗菌活性的分类一致性<90%,主要是小错误[111]。一个关于 VITEK 2 的研究,选择代表特定的 β-内酰胺类抗菌药物耐药表型的铜绿假单胞菌菌株进行测试,结果显示所有 β-内酰胺类抗菌药物的错误率升高[112]。一个关于 VITEK 和 Microscan 的研究得出结论:禁止使用自动化的检测系统检测分离自囊性纤维化患者的铜绿假单胞菌;仪器法和参考方法的一致性不佳是由于菌株生长缓慢及其黏液性所致[113]。关于 Phoenix 的研究报道显示,该仪器对于非发酵革兰阴性杆菌,分类一致性较低,主要原因是 β-内酰胺类抗生素、环丙沙星和复方新诺明有小错误和重大错误[86,114-115]。

黏菌素 AST 被广泛认为是有争议的、复杂的并依赖于检测的方法[116]。由于缺少 FDA 的折点,设备制造商无法提供非研究用途的黏菌素检测板。一项来自韩国的研究比较了商业方法用于测试多黏菌素对 213 株血流感染的不动杆菌属细菌的敏感性发现,和不添加吐温-80 的琼脂稀释法相比,VITEK 2 具有极佳的分类一致性(99.1%),而 MicroScan 仅为 87.3%[117]。另一项对碳青霉烯类不敏感鲍曼不动杆菌(20 株)和肺炎克雷伯菌(41 株)的评价也显示了 VITEK 2 和微量肉汤稀释法在不添加吐温－80 时有很高的分类一致性(96.7%)(使用的敏感和耐药 MIC 折点分别为≤2 μg/ml 和>2 μg/ml)[118]。另一项对黏菌素的评价以 CLSI 微量肉汤稀释法为金标准,对 117 株鲍曼不动杆菌进行了检测,结果显示Phoenix

NMIC/ID-96 板（41.4% VME）和 VITEK 2 AST XN05 药敏卡（37.9% VME）出现的极重大错误高得惊人[119]。另一项研究测试了黏菌素对 76 株碳青霉烯类耐药的肠杆菌的药敏，其中 21 株为 mcr-1 阳性，与微量肉汤稀释法（不添加吐温-80，黏菌素的敏感折点为≤2 μg/ml）结果相比，VITEK 2（N315 和 N275 药敏卡）的基本一致性和分类一致性分别为 93.4% 和 88.2%，Sensititre（GNX3F 药敏板）的基本一致性和分类一致性分别为 89.5% 和 90.1%；然而，VITEK 2 出现了 36% 的极重大错误，而 Sensititre 只有 4%[120]。在另一项研究中，使用 Sensititre RUO GNX2F 药敏板测定了 106 株碳青霉烯类耐药的克雷伯菌对黏菌素和多黏菌素 B 的 MICs，并与参考方法 CLSI 肉汤稀释法进行比较[121]。GNX2F 药敏卡与参比方法对于多黏菌素 B 基本一致性为 97.1%，对于黏菌素基本一致性为 92.5%；然而，当 EUCAST 折点应用于黏菌素数据时，重新计算后检测到四株极重大错误（14.3%；4/28）[121]。也有关于 VITEK 2 和微量肉汤稀释法检测替加环素的报道，发现 VITEK 2 对于临床分离的大肠埃希菌有很高的基本一致性（97%）和分类一致性，但对于肠杆菌科其他细菌较低（基本一致性 81%；分类一致性 59%）[122]，对于鲍曼不动杆菌基本一致性 99%；分类一致性 75%[123]。

六、其他检测系统

（一）Accelerate Pheno System

2017 年 2 月，FDA 批准 Accelerate Diagnostics 公司销售 Accelerate Pheno system 和 Accelerate PhenoTest BC（血培养）试剂盒，用于从阳性血培养样本中直接鉴定 14 种常见病原菌和 AST，以及直接鉴定 2 种念珠菌（仅用于鉴定）。Accelerate PhenoTest BC 试剂盒，包括 48 个流动池通道，可装载 5 ml 阳性培养液。每个盒子内包含两个凝胶电泳站和荧光原位杂交探针（用于鉴定）、抗菌药物和其他必需的试剂（用于自动样品制备、对目标细菌和真菌进行鉴定，以及对目标细菌做 AST）。对于每个样本来说，Accelerate PhenoTest BC 试剂盒加载的时间小于 10 min。Accelerate Pheno system 通过静电固定带电体、小体积（20～30 ml）的细菌细胞试验悬浮液来操作 AST，在一次性多通道流体盒中的单个通道上添加或不添加抗菌药物，并通过自动显微暗场图像捕获来检测生长变化。用形态动力学（细胞形态学、质量、分裂速率、异质性、细胞的异常生长模式和微菌落）细胞分析方法作为时间推移图像来分析子代克隆，图像分析软件生成生长概率评分以及 MICs 基于祖细胞向子代细胞克隆生长速率[124]。仪器通过使用软件从测量参数中计算出 MIC 值，并应用基于 2016 CLSI 和 FDA 折点的专家规则。将检测结果结合革兰染色结果一起解释。Accelerate PhenoTest BC 试剂盒包括 140 种用于鉴定和 AST 的实验，其中 116 种已提交给 FDA 并获得批准；其余 24 项检测可以在 RUO 模式下运行。该试剂盒还包括一个单一微生物试验，表明患者的阳性血液培养样本只有一个目标病原体。与培养革兰染色相匹配的单一病原菌允许直接报告结果而无须额外的实验室检查。用 12 种抗菌药物来评估革兰阴性菌，用 6 种抗菌药物来评估革兰阳性菌，以及 2 个筛选孔，1 个用头孢西丁来筛选 MRSA 孔，另 1 个孔用于筛选红霉素和克林霉素的 MLS_b 的耐药。

在 Accelerate Diagnostics 公司提交给 FDA 的报告中，其临床研究包括了 13 个试验地点的 1800 多个样本，对于鉴定来说，总的敏感性为 97.5%，特异性为 99.3%；对于 AST 结果与微量肉汤稀释法相比，总的基本一致性和分类一致性分别为 96.3% 和 96.4%（http://acceleratediagnostics.com/）。对含多种病原菌的阳性血液培养不能直接获得 AST 结果。在未来，Accelerate Pheno system 有望扩大应用于对其他类型标本中病原体的检测，包括支气管肺泡灌洗、组织、伤口和尿。

Brazelton de Cardenas 等[125]报道在平均 6.6 h 内可获得 Accelerate AST 结果（软件 v1.0），这些结果主要来自于儿科肿瘤患者的阳性血液培养。根据使用的比较方法和应用不同的折点，总体分类一致性为 91.2%～91.8%[125]。使用 FDA 的折点，对于 351 个病原菌抗菌药物的检测结果与微量肉汤稀释法比较其分类一致性为 91.2%（0% VME，1.4% ME，7.4% mE）[125]。使用 CLSI 2016 折点，对于 365 个病原菌抗菌药物的检测结果与微量肉汤稀释法比较其分类一致性为 91.5%（0% VME，1.1% ME，7.4% mE）[125]。

Marschal 等在一家医院诊断实验室对 115 例由革兰阴性菌引起的血流感染进行检测来评估 Accelerate Pheno system[126]。Accelerate Pheno system 对血流感染的革兰阴性菌鉴定正确率为 88.7%(102/115)且此次血流感染中的 97.1%(102/105)的病原菌都在本系统鉴定范围内。对于鉴定出的 91.3%(95/104)革兰阴性病原体直接检测的 AST 结果,与基于培养后再做的 AST (VITEK2 和 E-test)结果相比,分类一致性为 96.4% (VME 1.0%,ME 2.3%, mE 1.4%)[126]。厄他培南的分类一致性最高(100%),头孢吡肟的分类一致性最低(88.9%)。大多数检测到的差异主要出现在的β-内酰胺类抗生素中。这种加速系统获得 AST 结果的中位时间在阳性血培养处理开始后的 8.9 h。对于菌种鉴定(ID)和 AST,这种加速方法的检测中位时间为 6.7 h[126]。

Pancholi 等[127]最近报道了一项多中心研究的临床试验数据,通过使用新鲜的临床和传代的阳性血培养来评估 Accelerate Pheno system,并将其结果与 VITEK 2 的 ID 和肉汤微稀释法或 AST 的纸片扩散法进行比较。该系统鉴定了 14 种常见的病原菌和 2 种念珠菌,其敏感性为 94.6%~100%。新鲜阳性单一菌株的血培养阳性预测值为 97.3%。用 8 种抗菌药物对 5 种常见的革兰阳性球菌,以及 2 种耐药表型[甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌和葡萄球菌(MRSA/MRS)及可诱导的克林霉素耐药]进行了评价;总的基本一致性为 97.6%,分类一致性为 97.9%。总的 VME、ME 和 mE 分别为 1.0%、0.7%和 1.3%。用 15 种抗菌药物对 8 种革兰阴性杆菌进行了评价,结果显示总的基本一致性和分类一致性分别为 95.4%和 94.3%,总的 VME、ME 和 mE 发生率分别为 0.5%、0.9%和 4.8%[127]。

Charnot-Katsikas 等[128]在临床微生物实验室内通过连续对 232 瓶新鲜阳性血液培养中的 241 株病原菌(223 瓶为单一病原菌和 9 瓶多个病原菌)进行检测来评价 Accelerate Pheno system。病原菌鉴定的总敏感性和特异性分别为 95.6%和 99.5%。在抗菌药物敏感性检测方面,与常规方法相比,总的基本一致率为 95.1%,分类一致性为 95.5%。有 1 个 VME(极重大错误)和 3 个 ME(重大错误)。与标准流程相比,Accelerate Pheno system 对病原菌鉴定的时间和 AST 的时间分别减少了 23.47 h 和 41.86 h[128]。

(二)基质辅助激光解析电离飞行时间质谱

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)已被用来检测选定的抗菌药物/病原体组合的耐药性[129-138]。MALDI-TOF MS 在 AST 检测中有 4 种主要的用途:对抗菌药物降解的检测、当抗菌药物存在时对微生物生长的检测、对与抗菌药物耐药性相关蛋白的检测和对耐药克隆或同源的鉴定(如 MRSA)[137]。大多数关于使用 MALDI-TOF MS 作为 AST 检测的文献报告都涉及 Bruker Daltonik GmbH 公司(德国不来梅)的仪器,该仪器被称为 MALDI Biotyper (MBT)。MBT 耐药性检测包括 MBT-STAR(抗菌药物耐药性的选择性检测)-BL (β-内酰胺酶试验)、MBT-ASTRA(抗菌药物敏感性试验快速检测)和 MBT-RESIST(耐药性)检测[129]。

MBT-STAR-BL 测定法通过对含有 β-内酰胺酶的肉汤进行孵育,在大多数情况下经过 30~180 min 后就可检测到 β-内酰胺酶峰值特定的变化来监测 β-内酰胺酶活性。Bruker 提供了一种 MBT-STAR-Carba 体外诊断试剂盒(IVD),当与 MBT-STAR-BL IVD 软件和对照菌株一起使用时,可以快速检测(30~60 min)革兰阴性菌株中的碳青霉烯酶活性。该试剂盒使用亚胺培南作为其基准碳青霉烯药物。MBT-STAR-BL 测定法在其他 β-内酰胺酶水解的检测中也显示出良好的结果[130-135]。这种方法的局限性在于,可能无法检测到由其他机制导致 β-内酰胺类抗菌药物耐药。MALDI-TOF MS 还可以检测引起细菌耐药的靶蛋白,如青霉素结合蛋白的改变或 rRNA 的甲基化转移酶活性[131,136]。目前只研究了有限数量的耐药表型,包括 *mecA*、*vanA*、*vanB* 和 bla_{KPC}。

MBT-ASTRA 是一种半定量生长测定法,用于测量在同一标准下细菌在有无抗菌药物中生长的情况;原则上,它可以应用于任何抗菌药物检测[129]。已用 MBT-ASTRA 法测定了碳青霉烯类、氟喹诺酮类和氨基糖苷类药物的活性[129]。类似地,MBT-RESIST 测定法将稳定同位素标记的(非放射性的)氨基酸掺入新合成的细菌蛋白中,作为细菌生长的信号,通过对照和暴露在抗菌药物中细菌生长的对比来检测[138]。同样,原则上,

MBT-RESIST 可以应用于任何抗菌药物，但似乎最适合用于蛋白合成抑制剂。MBT-ASTRA 和 MBT-RESIST 这两种测定法克服了在 MBT-STAR-BL 测定法中其他耐药机制带来的问题。在有抗菌药物存在的情况下，新合成的蛋白质中含有多少同位素标记的氨基酸被用来决定一个菌株是敏感的还是耐药的。这种方法的主要局限性是需要一种作为重标记物的相应氨基酸的培养基。此外，必须事先知道被检测的蛋白峰，并为同一个菌种的所有菌株都是固定的。MBT-ASTRA 和 MBT-RESIST 测试肉汤中的细菌都要培养足够的孵育时间（如 2 h），这取决于菌种和抗菌药物。

七、正在研究中的 AST 方法

(一)Smarticles 技术

Smarticles 技术是由 GeneWEAVE (Los Gatos, CA) 公司开发的提供表型 AST 结果的测试平台。2015 年被罗氏公司收购（www. roche. com)。Smarticle 技术基于不复制的噬菌体。Smarticles 技术由 DNA 传递的噬菌体（被设计成专门附着在细菌的一个种类、属或科的表面）和定制设计的合成 DNA 分子（通过一个专有的生产过程）组成，当进入活细菌的细胞质时（即耐药的细菌）使它们表达荧光素酶，荧光素酶是一种添加底物试剂后产生光的分子，可以被检测到。只有活菌被检测到。检测的是独立于生长的活菌。在有抗菌药物存在的情况下，噬菌体所针对敏感的细菌将保持黑暗，而耐药的细菌则快速而有效地产生光。Smarticles 提供了直接从样品中检测 AST 的可能性，并且该试验不需要培养。

(二)其他正在研究中的 AST 方法

对正在研究中的 AST 方法有最新的综述[139-141]。在引用的综述中对所有的新方法进行了列表，并详细描述了几种即将取代传统 AST 系统的新方法[139-141]。除了质谱外，其他新一代方法包括基于流式细胞仪的方法、振动悬臂梁（共振质量测量技术；微生物称重），等温微量热法，异步磁珠旋转生物传感器，激光散射，显微成像分析[139-141]。AST 是一个复杂的过程，因为抗菌药物耐药性可能涉及多种机制，如酶降解（如 β-内酰胺酶）、由于孔蛋白损失或流出而导致的抗菌药物摄取改变、或抗菌药物靶位改变（如修饰的青霉素结合蛋白、甲基化核糖体 RNA）。因此，研究 AST 方法需要快速评估所有临床适用的抗菌药物对细菌细胞的累积效应，这些细菌细胞可能具有多种耐药机制，包括异质性耐药，并与目前依赖生长的耐药表型检测密切相关。另一个挑战将是开发广泛的核酸数据库，以支持下一代 DNA/RNA 测序系统。

考虑到全基因组测序[142]与常规 AST 方法一样敏感和特异，它是一种有前途替代培养对耐药性预测的方法。然而，可能由于异质性耐药的升高从而使对于所有相关抗菌药物在不同菌株之间的 MIC 变得不同，尤其在许多革兰阴性菌中是很明显的[139]。这可能会阻挠基因研究的发展[139]。

基于微量肉汤稀释的 AST 方法的主要局限性包括需要相对大量的活菌、检测前的复杂操作、有限的菌谱、检测中不稳定性、出结果的时间长和需要一定的成本[139]。

八、计算机专家系统

目前，在美国市场销售的几乎所有商品化 AST 检测系统都使用专家系统来帮助审核 AST 结果。专家系统可以识别需要专业人员关注部分药敏结果而优化工作流程，对于那些缺乏人力专家的小型实验室，也可以有效提高 AST 结果的报告质量[2,143]。通过连续监测，该计算机程序可以更快速地识别出不正确的结果及发放更一致的报告。然而，软件必须经常更新，才能反映出由国家组织的如 CLSI 指南推荐的耐药性判断新规则和其他变化。用户必须与生产商紧密合作，了解在他们的专家系统中哪些规则和评论已被激活，从而定制自己实验室的专家系统。在 AST 系统中容许定制不同程度的专家系统。理想情况下，无论在推荐意见修改前，还是修改后，一个专家系统都应报告实际 MIC 和结果解释。专家系统也可以推导出某种细菌对未测试药物的敏感性，并且能够发现细菌的 ID 和 AST 结果之间的不一致的现象[2,143]。

大多数专家系统制定规则的方法是以某时某一药物的 AST 结果中为焦点，而未考虑到同时检测的其他药物的结果。VITEK 2 AES 不同于一般的“解释性判读”，是对测试板中大多数抗菌药物的 MIC 值与数据库中已知的耐药表型和不同

耐药表型菌株的 MIC 分布进行比较[2,144-145]。对于基于表型指导的解释性判读，其理论基础为"一个单一的耐药机制通常介导耐多药性[146]"。已有一项多中心研究报道，VITEK 2 AES 结果判读与耐药基因表型之间具有良好的相关性[144,147]。在一个大学附属的微生物学实验室中，用 AES 和人力专家对于连续分离 259 株临床细菌 VITEK 2 测试结果进行分析，发现 65 株中只有 5 株(8%)进行 AES 的更正[143]。AES 的一个局限性已经受到关注：无法解释由单一机制而造成的多个不一致的结果[143,148]。Nakasone 等[149]发现 AES 不能准确报告万古霉素耐药肠球菌和大环内酯类药物肺炎链球菌的基因分型。2011 年，Winstanley 和 Courvalin[2]发表了一份关于 VITEK 2、Phoenix、Microscan 和其他专家系统的详细评述。

九、AST 结果评述

无论一个实验室是否使用商业的专家系统，重要的是要知道发现细菌不常见的"耐药"和"敏感"的结果，需要用相同或不同的方法验证细菌的鉴定并重复药敏试验[8,146]。遇到一个前所未有的表型，应及时复测，例如，一种肠杆菌科的细菌或铜绿假单胞菌对哌拉西林/他唑巴坦比哌拉西林更耐药[150]。还有一些抗菌药物，可能体外敏感，但缺乏临床疗效，因此应报告为耐药[8]。有关下列问题，应该查询最新的 CLSI M100 文件，包括特定细菌需要测试的药物、方法、解释标准、根据感染部位报告的抗菌药物和需要验证的罕见结果[8]。欧洲抗菌药物敏感试验委员会(EUCAST)网站(http://www.eu cast.org/expert_rules/)上的内容也可以作为专家规则协助解释 AST 结果。

十、如何选择一个 AST 检测系统

当要选择一个 AST 检测系统时，需要考虑的因素包括：成本、性能、工作流程、数据管理功能、与实验室已有 LIS 系统和医院信息系统组件的连接能力，以及制造商的技术支持[151]。当前用户反馈信息及期刊上同行评议是评估该系统性能的重要资源。制造商需要回答，某特定抗菌药物和细菌组合的难题是否解决、进展如何。评估 AST 检测系统性能的另一种方法是参加例如美国病理学家学会(CAP)的能力验证调查[12]，其最终的测试结果可了解该系统的性能指标，评价哪种药物/菌种组合存在高错误率。

AST 系统对 ID 的性能也很重要，因为专家规则是与细菌鉴定结果直接相关的。

关于实验室如何选择一个 AST 检测系统和所需进行的仪器性能验证[1988 临床实验室改进法案(the Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988)][152]的更多信息，见于《临床微生物学操作手册(Clinical Microbiology Procedures Handbook)》[151]、Cumitech 31A[153]和 CLSI M52 指南：商业微生物鉴定及抗菌敏感性测试系统[154]。

十一、总结及展望

AST 检测系统为多种抗菌药物/菌种组合提供了准确和可重复的结果。专家分析可以改善工作流程，提高结果报告的质量。由于自动化 AST 系统节省了劳力，这对于在当前或预计技术人员短缺的地区尤为重要。此外，短时间孵育体系提供了更快速的 AST 结果，如果与强有力的管理举措相结合，可改善患者护理，降低医疗成本。未来随着 AST 系统的进一步发展，会极大缩短报告时间，也将提高对临床的影响。下一代分子方法在检测中应考虑到细菌的多重耐药性，尤其在革兰阴性杆菌中，获得的结果必须与目前的参考表型方法相当，这些表型方法受限于细菌的数量、纯度和生长时间。

参考文献请扫二维码查阅

第75章 检测细菌耐药性的特殊表型方法*

PATRICIA J. SIMNER, ROMNEY HUMPHRIES

（王利君 译；胡继红、宁永忠 审校）

一、概述

特殊表型试验(special phenotypic tests)补充或替代标准的抗菌药物敏感性试验(antimicrobial susceptibility testing, AST)，用来明确细菌分离株对某种药物、某类药物的敏感性或检测特定的耐药机制或表型。许多表型试验需要与标准方法联合使用，抑或作为可选试验。特殊表型试验的结果，有些可用于指导治疗，而另一些可用于流行病学调查。本章将介绍不同类型的表型试验及其应用，以及适用于革兰阳性菌和革兰阴性菌的检测方法。表75-1总结了本章节中各种类型的细菌耐药性的特殊表型检测方法。

表 75-1 本章节中各种类型的细菌耐药性的特殊表型检测方法[a,b]

表型检测方法	细菌种类	方法描述	适用范围	结果解释
必要性补充试验：是不同于常规的纸片扩散法或微量肉汤稀释法的一种方法，检测对一种或一类抗菌药物敏感性或耐药性必须要进行的试验，而且无须附加试验来确证其敏感性或耐药性				
诱导型克林霉素耐药	金黄色葡萄球菌 凝固酶阴性葡萄球菌 肺炎链球菌 β溶血链球菌	克林霉素与红霉素同时检测的微量肉汤稀释法或D试验纸片扩散法	红霉素耐药但克林霉素敏感或中介的菌株，在报告克林霉素敏感前	CLSI指南建议将诱导型克林霉素耐药必须报告克林霉素耐药，而EUCAST仅需要备注，不必修改敏感性
青霉素敏感菌株检测β内酰胺酶	凝固酶阴性葡萄球菌	头孢菌素显色法	青霉素敏感菌株在报告敏感之前	产β内酰胺酶菌株需报告青霉素耐药
	金黄色葡萄球菌	头孢菌素显色法，如果头孢菌素显色法阴性，必须进行青霉素纸片扩散法抑菌圈边缘试验		任何青霉素敏感但头孢菌素显色法阴性的金黄色葡萄球菌，必须进行青霉素纸片扩散法抑菌圈边缘试验确证是否产β内酰胺酶
HLAR检测的微量肉汤稀释法或琼脂稀释法	肠球菌属	微量肉汤稀释法：500μg/ml庆大霉素或1000μg/ml链霉素 BHI琼脂稀释法：500μg/ml庆大霉素或2000μg/ml链霉素	检测HLAR	阳性，报告HLAR CLSI指南建议只能用BHI肉汤进行微量肉汤稀释法 EUCAST指南允许使用MHA 许多商业厂商也使用MHA或MHB
可选性补充试验：是不同于常规的纸片扩散法或微量肉汤稀释法的一种方法，对于检测一种或一类抗菌药物敏感性或耐药性可选性的试验，而且无须附加试验来确证其敏感性或耐药性				
β内酰胺酶检测(包括青霉素酶、AmpC、ESBL和碳青霉烯酶)	革兰阴性杆菌	表75-2	表75-2	

*本章包含Brandi Limbago and Jana M. Swenson在本手册第11版第73章中呈现的部分内容

（续 表）

表型检测方法	细菌种类	方法描述	适用范围	结果解释
青霉素敏感菌株检测β内酰胺酶	肠球菌属	头孢菌素显色法	β内酰胺酶阳性的肠球菌较罕见，所以实验室不常规检测。特殊病例时，可以检测	β内酰胺酶阳性必须报告青霉素耐药 因产β内酰胺酶的青霉素耐药肠球菌罕见 常规方法检测产β内酰胺酶的青霉素耐药不可靠，必须采用直接的头孢硝噻吩β内酰胺酶检测法
苯唑西林盐琼脂试验检测 MRSA	金黄色葡萄球菌	琼脂稀释法：MHA 含 4% NaCl 和 6μg/ml 苯唑西林	检测 MRSA	报告苯唑西林耐药 头孢西丁替代性实验优于 MRSA 琼脂补充性试验
PBP 2a 检测	金黄色葡萄球菌 凝固酶阴性葡萄球菌	乳胶凝集试验或免疫层析法	预测 *mecA* 介导的苯唑西林耐药	阳性结果报告 MRSA
hVISA 检测	金黄色葡萄球菌	万古霉素和替考拉宁浓度梯度试验：Etest 和 Etest-GRD		不限定结果报告 必须报告万古霉素 MIC 值
高水平莫匹罗星耐药	金黄色葡萄球菌	纸片扩散法（200μg 纸片）或单孔微量肉汤稀释法（256μg/ml）	检测高水平莫匹罗星耐药	阳性结果报告高水平莫匹罗星耐药
黏菌素耐药（非野生型）	肠杆菌科细菌，铜绿假单胞菌，鲍曼不动杆菌	快速的产色多黏菌素 NP 黏菌素纸片洗脱法	检测多黏菌素耐药 检测获得性或突变型耐药（非野生型）	阳性结果报告多黏菌素耐药或非野生型
筛选试验：筛选试验仅提供假定结果，如要获得特定结果（如筛选试验阳性时）情况下，则需要增加试验				
万古霉素琼脂筛选试验	金黄色葡萄球菌 肠球菌属	琼脂稀释法：BHI 含 6μg/ml 万古霉素	如果筛选试验阳性，需要 MIC 法确认万古霉素耐药性	不能报告筛选试验结果；不确定的万古霉素敏感性降低需要 MIC 法确认
HLAR 纸片扩散法	肠球菌属	庆大霉素和链霉素纸片扩散法	如果筛选试验不确定，需要 MIC 法	不确定结果必须用 MIC 法确认 敏感或耐药必须报告是否与作用于细胞壁的药物协同作用 EUCAST 指南中没有不确定性判断，所以不需要 MIC 法确认
EUCAST 苄青霉素（青霉素 G）1 U 纸片筛选β内酰胺耐药	流感嗜血杆菌	纸片扩散法	筛选所有β内酰胺耐药菌株，包括产β内酰胺酶和其他β内酰胺耐药机制（如 PBP）	依据 EUCAST 临床折点，抑菌圈≥12 mm，报告所有β内酰胺类耐药 抑菌圈<12 mm，检测β内酰胺酶，阳性时报告氨苄西林、阿莫西林、派拉西林耐药，其他临床治疗药物需进行药物敏感性试验 如果β内酰胺酶阴性，常规进行药物敏感性试验
黏菌素筛选方法	肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌	琼脂稀释法，MHA 含 4 μg/ml 多黏菌素	筛选试验阳性时，微量肉汤稀释法确认黏菌素耐药性	筛选试验阳性时，微量肉汤稀释法确认黏菌素耐药或非野生型
替代药物试验：用替代性药物测试取代目标抗菌药，一般在目标抗菌药无法获得或效果不佳时使用				
头孢西丁纸片扩散法预测苯唑西林耐药	金黄色葡萄球菌 路邓葡萄球菌 凝固酶阴性葡萄球菌（不包括假中间葡萄球菌和施氏葡萄球菌）	微量肉汤稀释法（仅限金黄色葡萄球菌和路邓葡萄球菌）和纸片扩散法	预测 *mecA* 介导的苯唑西林耐药	

（续 表）

表型检测方法	细菌种类	方法描述	适用范围	结果解释
头孢唑啉预测治疗uUTI的口服头孢菌素	大肠埃希菌 克雷伯菌属 奇异变形杆菌	微量肉汤稀释法和纸片扩散法	无并发症泌尿系感染治疗时，预测某些头孢菌素疗效	头孢唑啉药物敏感性结果预测某些口服头孢菌素治疗无并发症泌尿系感染的疗效
培氟沙星纸片预测环丙沙星敏感性	肠道沙门菌	纸片扩散法	预测环丙沙星敏感性降低	美国没有培氟沙星纸片，因此CLSI鼓励使用环丙沙星MIC试验，将优于纸片扩散法和培氟沙星纸片替代试验
苯唑西林纸片筛选试验检测青霉素耐药	肺炎链球菌	纸片扩散法	苯唑西林抑菌圈≥20 mm预测青霉素敏感，≤19 mm必须检测青霉素MIC	脑脊液或血液来源的肺炎链球菌必须检测青霉素MIC，而不使用苯唑西林纸片试验
监测试验：选择性或鉴定培养技术直接用于筛查样本中某一特定耐药表型的定植				
鼻拭子检测MRSA	金黄色葡萄球菌	显色培养基	MRSA的选择性培养基	显色培养基主要用于呼吸道标本、阳性血培养、伤口和粪便筛查MRSA
监测样本中VRE(粪便、肛周或直肠拭子)	屎肠球菌和粪肠球菌(培养基中不同颜色鉴别)	显色培养基	VRE的选择性培养基	延长培养时间或样本增菌可提高敏感性
监测样本中ESBL	肠杆菌科细菌	肉汤增菌、选择性培养和显色培养基	选择性检测超广谱头孢菌素耐药的革兰阴性菌	鉴定和药物敏感性试验均需要检测产ESBL需要增加表型和基因型试验
检测样本中CRO	肠杆菌科细菌 非发酵革兰阴性杆菌	肉汤增菌、选择性培养和显色培养基	选择性检测碳青霉烯耐药革兰阴性菌	鉴定和药物敏感性试验均需要检测产碳青霉烯酶需要增加表型和基因型试验

注：[a] 允许依据CLSI参考文献[1]修改，注意，M100每年更新，比本手册更新频率高；[b] UTI. 泌尿道感染；uUTI. 非复杂性泌尿道感染

(一)细菌耐药性表型试验的分类

最近，临床和实验室标准化协会(CLSI)明确了不同抗菌药物敏感性表型试验的定义，定义见M100S 28th版[1]。表型检测方法分为补充试验、筛选试验、替代药物试验和等效药物试验(表75-1)。依据修订的定义，补充试验是不同于常规的纸片扩散法或肉汤/琼脂稀释法的一种方法，用于检测对一种或一类抗菌药物敏感性或耐药性，而且无需附加试验来确证敏感性。当常规的纸片扩散法或微量肉汤稀释法不能检测出临床重要的耐药机制时，可能就需要做补充试验，或可能是可选性试验。可选性补充试验主要用于流行病学调查或感染控制。必须补充试验的一个例子，是检测金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、肺炎链球菌，或β溶血链球菌的诱导型克林霉素耐药，它们对红霉素耐药，但是对克林霉素敏感或中介。可选性补充试验的一个例子，是对大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌或奇异变形杆菌的分离株进行的超广谱β内酰胺酶(ESBL)试验，这些菌株对头孢菌素类敏感性降低。相比之下，筛选试验仅提供假定结果，如果获得某些结果，则需要确证试验，例如，使用万古霉素琼脂筛选检测耐万古霉素肠球菌。在这种情况下，如果筛查呈阳性，则需要确认万古霉素MIC。替代药物试验是用某一抗菌药物代替目标抗菌药物进行的试验。当目标抗菌药物出现问题或某些特殊药物试验无可行性情况下，可使用替代药物。最常见的替代药物试验是使用头孢西丁来预测金黄色葡萄球菌对苯唑西林的敏感性。另一个例子是使用苯唑西林纸片扩散预测肺炎链球菌对青霉素的敏感性。在所有情况下，替代药物本身不应该报告，而是报告目标药物。例如，报告金黄色葡萄球菌的苯唑西林而不是头孢西丁，报告肺炎链球菌的青霉素而不是苯唑西林。最后，等效药物试验指用一种药物预测同一类别中密切相关药物的结果。在实验室，等效药物试验可提高效率。在M100S中，等效药物在

表 75-1 和表 75-2 中两个药物之间用“或”标识，或在表的注释部分中说明[1]。等效药物的例子是治疗肠杆菌科的头孢噻肟和头孢曲松。

(二)标本与培养分离株的直接表型检测

抗药性的表型检测方法已被开发用于临床标本和培养分离株。大多数情况下，临床标本的耐药性表型检测是为了检测患者定植多重耐药菌(MDR)用于感染控制，如耐苯唑西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、耐万古霉素肠球菌(VRE)或碳青霉烯类耐药革兰阴性菌(CRO)，因此可以采取患者接触预防措施，以减少在医院内的传播。从培养分离株中进行的检测可用于指导治疗决策和(或)用于流行病学目的。本章将进一步详细介绍每种表型检测的应用。

(三)耐药性的表型与基因型检测的优缺点

一般来说，检测耐药性的表型方法是基因型方法的经济性替代方法。表型方法也有优点，能检测多种机制而不仅检测靶向耐药基因。这在革兰阴性菌中最为重要，因为革兰阴性菌的耐药机制往往是异质性的。例如，碳青霉烯酶表型检测方法可以检测所有产碳青霉烯酶菌株，与产生的酶类型无关，而不是用分子手段检测碳青霉烯酶的靶基因。此外，表型方法具有检测基因表达的优点，而不是简单地指示基因的存在，而不管基因是否表达。表型方法与药物敏感性试验的表型结果有较好的相关性[2]。一般来说，表型方法比基因方法的速度要慢，有些情况下基因方法不到一小时就可以完成。这种模式可能在不久的将来改变，因为随着新的显色和免疫显色方法的出现，可能在与分子检测相同的时间范围内检测耐药表型[3-4]。

(四)质控注意事项

与临床微生物学实验室报告的任何试验一样，用于临床治疗(包括感染控制目的)的检测在报告耐药表型时，需要适当的质量控制。需要在试验时或根据实验室的个性化质量控制计划设置阳性和阴性对照品。可从 CLSI 和 EUCAST 指南以及商业试验制造商处获得适当的质量控制菌株的推荐[1,5]。

(五)结果报告注意事项

根据试验，在报告部分或任何耐药表型结果之前，可能需要确认结果。此外，一些试验可用于报告治疗药物的耐药性，而另一些试验用于检测特定表型用于感染控制，但无须改变药物敏感性试验结果。下面将进一步详细描述确认试验的必要性及每个试验结果注意事项。

二、革兰阳性菌耐药表型检测

(一)革兰阳性菌 β 内酰胺类耐药检测

1. 葡萄球菌β内酰胺酶检测　葡萄球菌对青霉素耐药是由于产生青霉素酶，该酶由 *blaZ* 基因编码，*blaZ* 基因通常由质粒介导，可诱导表达。美国，不足 10%的葡萄球菌对青霉素敏感，因此很少考虑使用青霉素进行治疗葡萄球菌感染。路邓葡萄球菌例外，其约 50%菌株青霉素敏感，所以青霉素是一线用药[6]。同样，在一些欧洲国家，青霉素敏感的金黄色葡萄球菌常见[7]，因此青霉素可考虑用于需要长期治疗的情况(如骨髓炎)。在这些情况下，青霉素敏感性试验是有保证的。葡萄球菌青霉素敏感的折点为≤0.12 μg/ml[1,8]。青霉素 MIC 在敏感范围内时，极少菌株可能产生 β 内酰胺酶，因此目前建议在报告葡萄球菌对青霉素敏感之前，必须对青霉素敏感的葡萄球菌菌株进行补充的 β 内酰胺酶试验[1,8]。根据当地流行病学和实践经验，实验室可选择常规或单独根据特殊需求进行补充试验。

过去，商品化显色头孢菌素纸片(如头孢硝噻酚纸片)广泛应用于 β 内酰胺酶的检测。最近的数据表明，这些试验缺乏对金黄色葡萄球菌的敏感性。一研究显示，28 株 *blaZ* 阳性且青霉素 MIC≤0.12 μg/ml 的金黄色葡萄球菌中，仅有 11 (11/28,39%)株为头孢硝噻酚检测 β 内酰胺酶阳性[7,9-10]。测定 β 内酰胺酶最敏感的非分子生物学方法是青霉素抑菌圈边缘试验，用此方法可鉴定出 20/28(71%)*blaZ* 阳性的菌株[10]。后续未发表的研究数据也证实了抑菌圈边缘试验的性能。CLSI 和 EUCAST 都推荐：如果金黄色葡萄球菌的青霉素 MICs 或抑菌圈直径在敏感范围内，在报告为青霉素敏感之前应进行抑菌圈边缘试验[1,8]。出现陡峭边缘的为 β 内酰胺酶阳性(也称

为“峭壁”cliff)，报告青霉素耐药。出现模糊边缘的为β内酰胺酶阴性(也称为“海滩”beach)，报告青霉素敏感。抑菌圈边缘的解释是主观判断，因此要用反射光仔细检查抑菌圈边缘[9]。

但凝固酶阴性葡萄球菌(CoNS)不建议做抑菌圈边缘试验。尤其，对路邓葡萄球菌的特异性差。最近一研究显示，51/56*blaZ*阴性的路邓葡萄球菌的抑菌圈边缘试验阳性(特异性9.1%)[6]。CLSI推荐在报告CoNS(包括路邓葡萄球菌)青霉素敏感结果之前应对其进行诱导的头孢硝噻酚试验[1]。在之前提及的研究中，36株*blaZ*阳性的路邓葡萄球菌头孢硝噻酚试验阳性，而56株*blaZ*阴性的路邓葡萄球菌头孢硝噻酚试验无阳性[6]。

如青霉素应用于β内酰胺酶阴性、青霉素敏感的菌感染治疗，CLSI推荐对来自同一患者后续分离的所有葡萄球菌均应进行MIC法和β内酰胺酶试验，因为少数携带*blaZ*的青霉素敏感株，使用MIC法和β内酰胺酶试验检测时可显示为耐药[1]。

2. 肠球菌β内酰胺酶检测 肠球菌对青霉素的耐药性主要是通过低亲和力青霉素结合蛋白(PBPs)的过表达或PBPs的改变介导的。对青霉素敏感的肠球菌对氨苄西林敏感[11]，但存在青霉素耐药而氨苄西林敏感的表型；这些菌株也对哌拉西林和亚胺培南耐药[12]。偶尔，肠球菌的分离株，主要是粪肠球菌，含有上述*blaZ*基因。1981年首次报道临床分离的粪肠球菌产生β内酰胺酶[13]。之后的整个20世纪90年代，产β内酰胺酶粪肠球菌[14-17]和产β内酰胺酶的屎肠球菌[18]均有零星报道。当今，产β内酰胺酶的肠球菌鲜有报道。有关的最新报道是2004－2005年从印度一例患者血液分离的粪肠球菌[19]，还有10例为2010年从意大利患者分离的10株菌[20]。因此，不建议常规检测肠球菌的β内酰胺酶[21]，除非青霉素治疗明显无效时。

3. 苯唑西林纸片筛选试验检测青霉素耐药的肺炎链球菌 20世纪70年代发生在南非的一次由多重耐药肺炎链球菌引起的暴发感染中，首次采用1 μg苯唑西林纸片筛选青霉素耐药的肺炎链球菌[22-24]。此后，该方法广泛用于对青霉素不敏感的肺炎链球菌的检测，如果以脑膜炎分离肺炎链球菌折点≤0.06 μg/ml判断，该方法有较高的敏感性，但特异性较差[25]。CLSI现推荐对来自非脑膜炎的分离菌株，如果抑菌圈直径≥20 mm，应认为该菌株对氨苄西林、氨苄西林-舒巴坦、阿莫西林、阿莫西林-克拉维酸、头孢克洛、头孢地尼、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢泊肟、头孢丙烯、头孢洛林、头孢唑肟、头孢曲松、头孢呋辛、多利培南、厄他培南、亚胺培南、美罗培南和口服及肠外青霉素敏感，不需要进行进一步检测[1]。EUCAST也提出相同的试验建议。用此方法鉴定为青霉素非敏感的菌株，实际上青霉素可能是敏感、中介或耐药。所以针对抑菌圈直径≤19 mm的菌株都必须进行青霉素的MIC测定，以确定是否对青霉素耐药[21,25]。对于从脑脊液或血液中分离的菌株常规应检测MIC而不是使用苯唑西林纸片法筛选。

4. 苯唑西林耐药葡萄球菌的检测 苯唑西林耐药金黄色葡萄球菌通常称为甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌(MRSA)。即使甲氧西林已不再使用，但MRSA的缩写仍在使用，在本书中亦是如此。金黄色葡萄球菌对苯唑西林的耐药机制至少有4种：①获得位于染色体上的*mecA*基因，编码产生青霉素结合蛋白2a(PBP 2a)，降低了细菌与青霉素类抗菌药物的亲和力。②在动物来源的菌株中发现一种*mecC*基因，可编码产生PBP异构体。③产生大量的β内酰胺酶，使药物灭活。④固有的PBPs经修饰，降低细菌对药物的亲和力[26]。

在世界范围内，由*mecA*基因介导的耐药机制最常见，研究最深入，最具有代表性。只有*mecA*和*mecC*介导的苯唑西林耐药在CoNS中出现。快速、可靠地检测*mecA*基因介导的耐药被公认是实验室重要的工作之一。目前已报道有多种有关该耐药机制的实验室检测方法。从2011年以来，*mecC*基因介导的耐药已在来自人类、家畜及其他野生动物的金黄色葡萄球菌中发现，但其流行率低，即使在与动物有密切接触的人群中，也很少检测到[27-29]。尽管其他耐药机制的流行率尚不清楚，但推测在金黄色葡萄球菌中非*mec*基因介导的耐药非常罕见，这种耐药机制在路邓葡萄球菌(*S. lugdunensis*)中也尚未发现。

携带*mecA*基因(经典耐药性)的菌株可表现为异质性(heterogeneous)或同质性(homogeneous)耐药。用标准体外试验方法检测，同质性耐药菌表现为几乎所有细菌均耐药；而异质性耐药

菌则表现为有的亚群敏感，有的亚群耐药，通常在 $10^4 \sim 10^8$ 个细菌中仅有 1 个细菌为 *mecA* 基因阳性[30-31]。CoNS 中，异质性耐药可能更常见[32]。

金黄色葡萄球菌和路邓葡萄球菌苯唑西林的 MIC 折点为：≤2 μg/ml 为敏感；≥4 μg/ml 为耐药[1,8]。异质性耐药菌株的苯唑西林 MICs 有时在折点附近（2～8 μg/ml），可能被误认为敏感。1999 年，CLSI 下调了苯唑西林的 MIC 折点，≤0.25 μg/ml 为敏感，≥0.5 μg/ml 为耐药，使得 CLSI 参考方法检测苯唑西林耐药 CoNS 的敏感性有所提高。然而，该折点仅适用于检测表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌和人葡萄球菌[33-35]。对于其他 CoNS［如腐生和松鼠葡萄球菌（*Staphylococcus sciuri*）］，苯唑西林折点缺乏特异性，例如采用经典的折点范围 MICs 0.5～2.0 μg/ml[36-37] 时，有很多 *mecA* 阴性菌株用纸片法和 MIC 法检测可能表现为耐药。CLSI 历史上推荐使用头孢西丁纸片扩散试验、*mecA* PCR 或 PBP 2a 试验来检测这一范围内的 CoNS 分离株的苯唑西林 MIC。然而，在 2018 年，取消了使用头孢西丁纸片法来取代该范围内的苯唑西林 MIC，这是因为在所有种类的 CoNS 中检测 *mecA* 的敏感性不确定。

非 *mecA* 基因介导的高产 β 内酰胺酶［临界性苯唑西林耐药金黄色葡萄球菌（BORSA）］或产生修饰的 PBPs 菌株（MOD-SA 耐药）的苯唑西林 MICs 也在折点附近。在进行苯唑西林 MIC 检测时添加 β 内酰胺酶抑制药（如克拉维酸）可将 BORSA 型耐药与经典型（*mecA* 阳性）耐药或 MOD-SA 型耐药相区别，BORSA 型耐药在添加 β 内酰胺酶抑制药后 MIC 可降低 2 个稀释度或以上。BORSA 型或 MOD-SA 型耐药通常不表现为多重耐药。

苯唑西林不能完全诱导金黄色葡萄球菌 *mecA* 基因表达，可导致其抑菌圈内有少量或模糊生长，从而影响苯唑西林纸片扩散法结果的判读，也会影响药敏试验的敏感性和特异性[35,38]。因此，若用苯唑西林检测葡萄球菌，仅推荐使用 MIC 检测方法。但是，也有例外，如动物源的葡萄球菌、假中间葡萄球菌（*Staphylococcus pseudintermedius*）[39] 和施氏葡萄球菌（*Staphylococcus schleiferi*），CLSI 最近引入了苯唑西林纸片扩散法[21]，后面章节中会详述。对金黄色葡萄球菌的表型检测方法有：①使用头孢西丁替代苯唑西林进行常规药敏试验。②苯唑西林-盐琼脂筛选法。

（1）使用头孢西丁代替苯唑西林进行药敏试验：头孢西丁作为一种替代品来预测金黄色葡萄球菌苯唑西林的耐药性，与苯唑西林相比敏感性和特异性更高[40]。头孢西丁微量肉汤稀释法和纸片扩散法均可用于检测金黄色葡萄球菌和路邓葡萄球菌。头孢西丁纸片扩散法已常规用于检测金黄色葡萄球菌和路邓葡萄球菌耐药，结果≤21 mm 报告为苯唑西林耐药，≥22 mm 报告为苯唑西林敏感[8,21]。使用反射光观察，该试验结果容易读取，并且不需要仔细检查抑菌圈内的模糊生长和小菌落。根据多中心研究验证[40]，用于预测 *mecA* 基因介导的金黄色葡萄球菌和路邓葡萄球菌对苯唑西林耐药的头孢西丁 MIC 折点已包括在 CLSI M100 文件中；头孢西丁 MICs≤4 μg/ml 为苯唑西林敏感，≥8 μg/ml 为苯唑西林耐药。EUCAST 也批准使用头孢西丁筛选苯唑西林的耐药性。头孢西丁纸片扩散法检测 *mecA* 和 *mecC* 介导的金黄色葡萄球菌边缘性（borderline）耐药有很好的性能，但是对 MOD-SA 或 BORSA 型耐药（译者注：非 *mec* 基因介导）不能用头孢西丁，只能用苯唑西林检测。由于此类耐药表型较为罕见（苯唑西林 MIC 一般为 2～16 μg/ml），故与临床的相关性尚不清楚，实验性研究（experimental studies）显示，可能对临床结局无重要影响[43]。这些耐药模式的临床意义尚不确定，所以目前临床上单独使用头孢西丁试验是一种合理的方法。当 β 内酰胺类药物治疗无效时，可能需要进行额外的测试，包括检测苯唑西林或适当的分子生物学试验（第 79 章）。

尽管头孢西丁纸片扩散法检测 *mecA* 阳性 CoNS 的结果因菌种不同而有所不同，但与苯唑西林 MIC 法比较，敏感性相同，而特异性更高[35,44-45]。头孢西丁纸片扩散法检测 *mecA* 阳性的模仿葡萄球菌结果不可靠[35]，原因未知。但对于区分 *mecA* 阳性和阴性的腐生葡萄球菌结果是可靠的。也有研究显示，如果使用金黄色葡萄球菌的折点而不是 CoNS 的折点去解释结果可提高其特异性[46]。EUCAST 中，腐生葡萄球菌是相同的折点。头孢西丁纸片扩散法无法检测 CoNS 中假中间葡萄球菌，施氏葡萄球菌的 *mecA*[39]。CLSI 警示用头孢西丁检测假中间葡萄球菌，施氏

葡萄球菌的苯唑西林敏感性，而 EUCAST 仅警示用于检测假中间葡萄球菌[8]。检测这些菌 *mecA* 时，苯唑西林 MIC 法和头孢西丁纸片扩散法的敏感性和特异性都有明显优势，相应纸片扩散法折点是≥18 mm（苯唑西林敏感），≤17mm（苯唑西林耐药），苯唑西林的 MIC 折点（≤0.25 μg/ml 为敏感，≥0.5 μg/ml 为耐药）。近期，一项多个实验室参与的研究对使用头孢西丁 MIC 折点预测 *mecA* 介导的 CoNS 耐药性进行评估，结果显示，采用不同厂家的肉汤测定结果存在差异，并且苯唑西林敏感亚群和耐药亚群的结果相互重叠，提示头孢西丁 MIC 法检测结果不及苯唑西林的 MIC 法，所以头孢西丁 MIC 折点没有被 CLSI 和 EUCAST 采纳。检测 CoNS 苯唑西林耐药性的方法一直差强人意，CLSI 一直在寻求改进方法。检测表皮葡萄球菌与非表皮葡萄球菌的方法是不同的，所以当患者的可选治疗方案有限时，必须将 CoNS 鉴定到种，并检测特定药物的 MIC，以及采用分子手段检测 *mecA* 或 PBP 2a。

（2）金黄色葡萄球菌的苯唑西林盐琼脂补充试验：尽管苯唑西林-盐琼脂筛选试验的敏感性较头孢西丁纸片法低，但已被广泛应用[41, 47-48]。用此方法检测携带 *mecA* 基因的路邓葡萄球菌尚未被研究。有研究者用 4 μg/ml 头孢西丁的琼脂稀释法进行筛选[38, 49-50]，结果与苯唑西林-盐琼脂法一致，并且其敏感性和特异性等于或优于苯唑西林-盐琼脂法[50-52]，但该方法还没有被 CLSI 批准作为筛选试验。

CLSI 推荐 MH 琼脂添加 4% 氯化钠和 6 μg/ml 苯唑西林作为琼脂筛选培养基[1, 21]。使用在非选择性琼脂平板上过夜生长的菌落来制备菌悬液，具体方法是：挑取菌落加入到肉汤（如胰蛋白酶大豆肉汤）或生理盐水中配制成相当于 0.5 麦氏浓度的菌悬液，选择以下方法将菌悬液接种到苯唑西林琼脂筛选平板上：①用棉签浸入菌悬液，挤出棉签上多余的液体，在苯唑西林琼脂筛选平板上涂布接种直径为 10～15 mm 区域（或涂布平板的 1/4 区域）；②用 1 μl 接种环蘸取菌悬液接种至平板，接种直径为 10～15 mm。平板放入 33～35℃ 空气环境中培养 24 h，检查有无生长，若有超过一个菌落的生长则表示耐药。本试验要注意的是培养温度不能超过 35℃，若培养温度超过 35℃则不能检出 MRSA[1]。偶尔有异质性耐药菌株漏检，这可能是由于耐药基因表达的频率较低[53]，或是培养基的批间差异，或是不同厂商产品之间的差异所致[54-55]。苯唑西林盐琼脂筛选法不能检测非 *mecA* 基因介导的临界性耐药菌株。有学者使用收集的苯唑西林临界耐药菌株（苯唑西林 MIC 为 1～4 μg/ml），或之前纸片扩散法与 MIC 法检测结果不一致的菌株，对参考方法和检测 *mecA* 基因的商品化方法进行评价[38]。结果显示，头孢西丁 MIC 法和纸片扩散法检测 *mecA* 基因介导的金黄色葡萄球菌耐药远优于苯唑西林，包括苯唑西林盐琼脂平板筛选法和苯唑西林 MIC 方法。苯唑西林盐琼脂筛选试验不适用于检测 CoNS 中的苯唑西林耐药性，因为每毫升使用的 6 μg 苯唑西林，高于 CoNS 的折点[1]。

（3）苯唑西林耐药葡萄球菌其他检测方法：检测苯唑西林耐药葡萄球菌的其他商品化快速检测方法包括：①直接将患者标本（通常为鼻拭子）接种在含抗菌药物和显色指示剂的琼脂平板上；②乳胶凝集试验检测 PBP 2a；③自动化 PCR 分析（第 79 章）。

FDA 已批准几种显色平板（chromogenic agars）可用于检测医院感染监测标本中的 MRSA。这些培养基的具体成分是有专利的，且制造商不同，成分也不相同，但都含显色剂和选择性的成分。显色指示剂可使金黄色葡萄球菌菌落显示一种特别的颜色，以与其他葡萄球菌区别；选择性成分则抑制非苯唑西林耐药菌生长。这些培养基可用于直接对院内感染监测拭子进行检测，且可在接种 24 h 后直接读取结果，检测时间比传统 MRSA 培养法缩短 1～3 天。尽管商品化的显色琼脂性能不同，但大量研究证明，对于检测 MRSA 定植，显色琼脂法与传统的培养方法有良好的相关性，且不同厂家的显色琼脂检测性能相近[56-59]。这种显色培养基用于对特殊患者进行监测有特别的优势，如囊性纤维化患者，体内可能定植苯唑西林敏感金黄色葡萄球菌或多种细菌。最近两项研究显示，显色琼脂可将敏感性提高 9%～50%，并减少了 24～48 h 的周转时间[56, 60]。一些研究指出，在接种 MRSA 选择性琼脂平板之前先用肉汤增菌尤为重要，尤其是在定植量较低时，可最大限度地增加显色平板的检测敏感性[58, 61]。此外，这些培养基检测 *mecC* 介导的耐药性的性能不一[62]。

尽管在美国并不是所有的显色琼脂都被 FDA 批准用于临床检测，但研究已证实这些琼脂对于检测临床标本中的 MRSA 是有效的。在一项研究中，使用显色琼脂对含有多种细菌的临床标本，如浅表伤口、气管吸取物和痰等进行检测，结果显示，MRSA 的总检出率提高到 21%，时间缩短到 1 天[63]。另一项研究对脓液、呼吸道标本、粪便及阳性血培养标本进行检测[64]，结果显示，显色琼脂比传统方法效果更好。针对有革兰阳性球菌生长的阳性血培养标本进行研究，结果显示，MRSA 显色琼脂具有非常好的敏感性和特异性，且检测时间比传统方法提前 12～24 h[59,65-66]。

使用商品化的胶乳凝集试验快速检测葡萄球菌 PBP 2a，包括 PBP 2′胶乳凝集试验（Oxoid Limited，Basingstoke，United Kingdom）、免疫层析法（immunochromatographic assay）、PBP 2a 葡萄球菌培养分离（PBP 2a Culture ColonyTest）（Alere）。FDA 已批准 Oxoid PBP2′胶乳凝集试验检测金黄色葡萄球菌和 CoNS，但 CoNS 需要苯唑西林或头孢西丁诱导。两种试验均未检测到 mecC 编码的 PBP 2a[67]，但都能很好地检测 mecA 编码的 PBP 2a[68]。

（二）检测肠球菌与葡萄球菌的万古霉素耐药

1. 检测肠球菌万古霉素耐药 CLSI 规定的万古霉素判读标准为：敏感≤4 μg/ml；中介 8～16 μg/ml；耐药≥32 μg/ml。最常见的 3 种耐药表型为：①高水平万古霉素耐药（MIC≥64 μg/ml），伴有替考拉宁耐药（MIC≥16 μg/ml）（VanA 表型）；②中高水平至高水平万古霉素耐药（MIC16～512 μg/ml），多数情况下不伴有替考拉宁耐药（VanB 表型）；③鹑鸡肠球菌和铅黄肠球菌为固有的万古霉素低水平耐药（MIC2～32 μg/ml）（VanC 表型）[69]。VanA 和 VanB 表型在粪肠球菌和屎肠球菌中最常见，但在其他肠球菌种也有发现，包括铅黄肠球菌和鹑鸡肠球菌[69]。现有报道的导致万古霉素耐药的其他基因有：*vanD*[70]、*vanE*[71]、*vanG*[72]、*vanL*[72]、*vanN*[73]和 *vanM*[74]。第 24 章详细介绍了这些基因相关的表型特征，包括携带这些基因的细菌种类及其万古霉素和替考拉宁的 MIC 值。最近，发现了肠球菌万古霉素敏感性具有可变性。这些菌最初对万古霉素敏感，但携带 *vanA* 基因，能在体内发展为万古霉素耐药[75]。CLSI 建议 *vanA* 阳性，万古霉素敏感的肠球菌报告为万古霉素耐药[70]。

很多临床实验室常用的方法，包括纸片扩散法、Vitek2 系统（bioMérieux，Durham，NC）、Phoenix 系统（BD，Sparks，MD），和 MICroScan 系统（Beckman Coulter，Sacramento，CA），可很好地测定出万古霉素耐药肠球菌[76-79]。纸片扩散法检测需要培养 24 h，并采用透射光观察抑菌圈。

Willey 等[80]首次介绍了万古霉素琼脂筛选法（vancomycin agar screening test）并在 1993 年被 CLSI 采纳[81]。当时报道的敏感性和特异性分别为 96%～99% 和 100%。使用 BHI 琼脂加入 6 μg/ml 万古霉素配制成 BHI-V6 琼脂平板（BHI-V6）。取在普通琼脂平板上生长 18～24 h 的菌落配制成 0.5 麦氏浊度的菌悬液，取 1～10 μl 菌悬液点种在筛选平板表面或涂布接种直径 10～15 mm的区域。最终每点接种浓度为 10^5～10^6 CFU。接种后的平板放置在 35℃的空气环境中培养 24 h。有大于一个菌落生长即为推测性耐药（presumptive resistance）。

但是，该方法对于检测含有 *vanC* 基因的鹑鸡肠球菌和铅黄肠球菌的敏感性或耐药性是容易混淆的，因为它们在琼脂筛选平板上的生长具有可变性。这两种固有携带 *vanC* 基因的肠球菌万古霉素的 MIC 在 2～32 μg/ml 不等[69]。由于这些细菌对万古霉素的 MIC 通常＞4 μg/ml，因而很可能在琼脂筛选平板上生长，并且增加接种量和使用营养丰富的培养基可促进其生长。大多数含 *vanC* 基因的肠球菌在 30℃时动力阳性，铅黄肠球菌有典型黄色素，这些特征已经用于含 *vanC* 基因的肠球菌与其他肠球菌的鉴别[82]。然而，一些鹑鸡肠球菌和铅黄肠球菌没有动力，因此能否发酵 1%甲基-α-D-吡喃葡糖苷（MGP）是一种将鹑鸡肠球菌、铅黄肠球菌与粪肠球菌、屎肠球菌鉴别的更好方法。所有含 *vanC* 的肠球菌均可利用 MGP 产酸，但是，粪肠球菌和屎肠球菌不能利用 MGP[83]（第 24 章）。治疗铅黄肠球菌和鹑鸡肠球菌的临床结果数据很少[84]，但 CLSI 建议将其报告为对万古霉素耐药，不论 MIC 值大小[1,21]。

几种选择性显色培养基已被 FDA 批准用于检测监测标本中的 VRE。与检测 MRSA 的培养基一样，VRE 显色培养基的确切成分是有专利

的，并且因制造商而异。显色指示剂可使粪肠球菌和屎肠球菌菌落呈现出区别于培养基上其他物种的特征颜色，并且选择性成分可抑制不耐万古霉素的细菌生长。有些培养基对屎肠球菌和粪肠球菌可产生不同的颜色。与标准培养基方法[85-90]相比，在这些培养基上检测 VRE 的敏感性在 50%～90%。在低患病率人群中，当培养板孵育 48 h(而不是 24 h)，以及如果 35℃下在 BHI 中与 3 μg/ml 万古霉素过夜孵育，进行预富集步骤，可以提高敏感性[87]。

2. 检测葡萄球菌万古霉素耐药 2006 年 1 月，CLSI 将金黄色葡萄球菌对万古霉素药敏的解释标准变更为≤2 μg/ml 为敏感、4～8 μg/ml 为中介、≥16 μg/ml 为耐药。凝固酶阴性葡萄球菌(CoNS)药敏的折点没有改变，依然是≤4 μg/ml 为敏感、8～16 μg/ml 为中介、≥32 μg/ml 为耐药[1]。与苯唑西林和头孢西丁耐药性的检测不同，路邓葡萄球菌对万古霉素耐药性的检测应该用 CoNS 折点。金黄色葡萄球菌对万古霉素中介折点降低至 4 μg/ml 的原因是：①万古霉素 MIC 为 4 μg/ml 的金黄色葡萄球菌尽管很少见，但可能代表一种异质性耐药的群体；②有限的临床治疗数据表明，这些菌株感染后单独使用万古霉素治疗无效[91]。万古霉素中介的金黄色葡萄球菌(vancomycin-intermediate *S. aureus* strains)(MIC4～8 μg/ml)称为 VISA，万古霉素耐药的金黄色葡萄球菌(MIC≥16 μg/ml)称为 VRSA。万古霉素敏感性降低 CoNS 称为 VISS (vancomycin-intermediate *Staphylococcus* spp.)，即万古霉素中介的除金黄色葡萄球菌以外的其他葡萄球菌。

截至 2017 年 10 月，在美国分离出 14 株 VRSA，其中 8 株分离自密歇根州，4 株分离自特拉华州，1 株分离自纽约州，1 株分离自宾夕法尼亚州[92-94]。其他国家也有检出 VRSA 的报道，包括印度、巴基斯坦、伊朗，葡萄牙和巴西[95-100]。目前，所有分离的 VRSA 菌株均携带有 *vanA* 基因，并且患者均有基础性疾病病史，如既往有 MRSA 和(或)VRE 的感染和定植史；多数患者先前接受过万古霉素治疗。VRSA 菌株的万古霉素 MIC 为 32～1024 μg/ml，用 30 μg 的万古霉素药敏纸片扩散法检测显示无抑菌圈。

VISA 的耐药性不是因为获得 *van* 基因，而是由于细胞壁的变化使得这些菌株对万古霉素不敏感[101-102]。目前研究显示，VISA 耐药表型并非由单基因突变所致，可能是由于几个不同基因突变的结果。当 VISA 首次出现时，研究者就关注到一些常规的药敏试验方法无法检测的万古霉素中介葡萄球菌[103]，所以 VISA 的真正分离率很难评估，但可以肯定的是 VISA 的分离率远高于 VRSA。非 *van* 基因介导的万古霉素耐药凝固酶阴性葡萄球菌被称为 VISS，有报道称 CoNS 菌株的万古霉素 MIC 升高也是由于细胞壁改变所致[104-105]。最近，在加拿大的两个新生儿重症监护病房发现了一组 VISS，其中万古霉素 MICs 升高的发生率为 88%[106]。

CLSI 推荐微量肉汤稀释法作为 VISA 和 VRSA 可靠的检测方法，推测也可用于检测 VISS。但是，纸片扩散法不能用于检测 VISA 或 VISS，因这些菌株的抑菌圈通常在敏感范围内(≥15 mm)。所以，2014 年 CLSI M100 中将纸片扩散法的相关内容全被删除。但如果万古霉素纸片扩散的结果为 6 mm(无抑菌圈)，可认为检出携带 *vanA* 基因的金黄色葡萄球菌，如果遇到这种情况，应确认鉴定的结果和细菌的纯度，并进行万古霉素 MIC 检测。对于万古霉素 MIC≥8 μg/ml 的金黄色葡萄球菌，使用检测 VRE 的 BHI-V6 筛选琼脂是一种较为敏感的方法，但对于 MIC 为 4 μg/ml 的金黄色葡萄球菌检测结果不确定[107]，另外，这种方法不能用于检测 VISS。大多数药敏试验方法均可以用于检测 VRSA，但不能准确检测 VISA。需要使用附加试验确认万古霉素的耐药性。首先，应确认分离株鉴定的准确性和纯度，并使用确认的方法测定其 MIC。对于大多数实验室而言，最有效的方法是 Etest(bioMérieux)。然而，研究表明，与微量肉汤稀释法相比，Etest 法检测的万古霉素 MICs 略微偏高[107-108]。推荐将所有万古霉素 MIC≥8 μg/ml 的金黄色葡萄球菌分离株送至参考实验室进行确认。在美国，有几个州要求检出 VISA 和(或)VRSA 时，报告当地公共卫生部门。

3. 异质性万古霉素中介葡萄球菌(hVISA)的检测 异质性万古霉素中介的金黄色葡萄球菌是指用标准方法检测万古霉素药敏结果为敏感，但在敏感的菌群中包含万古霉素 MIC≥4 μg/ml 的耐药亚群(通常 10^5～10^6 个细胞中有一个)，

hVISA 于 1997 年首次定义[109]。一些 hVISA 菌株的 MIC 为 4 μg/ml，可通过标准方法检测；而另外一些 hVISA 菌株的 MIC≤2 μg/ml，用标准方法不能检出。hVISA 的检出率与其临床意义并无一致性。检测 hVISA 的"金标准"是菌谱分析/曲线下面积计算法，但该方法并不适用于常规检测[110]。目前，还没有适用于临床实验室使用的检测 hVISA 的标准方法。现有 2 种 Etest 方法可检测 hVISA：①宏量 Etest 法；②Etest GRD 法。宏量 Etest 法是将大量的菌接种于 BHI 琼脂平板，分别贴上万古霉素和替考拉宁标识，若任何一种纸片的 MIC≥8 μg/ml 或单独替考拉宁的 MIC≥12 μg/ml，则认为是 hVISA[111]。一些研究对该方法进行了评估，发现宏量 Etest 法鉴定 hVISA 的敏感性并不理想（57%～89%），阳性预测值为 21%～71%[112-113]。Etest GRD 法是用含 5% 羊血的 MH 琼脂平板，接种 0.5 麦氏单位浓度的菌悬液，并贴上一个含有万古霉素和替考拉宁两种药物的药敏条，再根据这 2 种药物特定的 MIC 判断是阳性还是阴性[114]。有报道，Etest GRD 法检测 hVISA 的敏感性为 57%～100%，阳性预测值是 16%～80%[112-113]。

(三)氨基糖苷类高水平耐药肠球菌的检测

由于氨基糖苷类抗菌药物对肠球菌杀菌作用弱（MIC 为 8～256 μg/ml），因而不能单独用于感染的治疗[115]。这种固有的中度耐药是因为细菌对氨基糖苷类抗菌药物摄取较少[116]。肠球菌获得对氨基糖苷类抗菌药物耐药主要有 2 种机制，一种是基因突变使药物与核糖体结合减少，如链霉素耐药（称之为核糖体耐药），另一种更常见的机制是获得新的耐药基因，该基因编码的酶可修饰氨基糖苷类抗菌药物（称之为获得性耐药）。获得性氨基糖苷类耐药通常与其 MIC 相对应，其 MIC 通常显著高于常规药敏试验所使用的药物浓度，如链霉素≥2000 μg/ ml，庆大霉素≥500 μg/ml，所以称之为高水平耐药（high-level resistance，HLR）[7]（第 24 章和第 71 章）[116]。

氨基糖苷类抗菌药物和作用于细胞壁的抗菌药物之间的协同作用，可直接使用较繁琐的时间杀菌试验确定[8-9]或使用较为简单的筛选试验预测。常规工作中仅需检测庆大霉素和链霉素 2 个药物的敏感性，肠球菌如果对庆大霉素耐药，认为对妥布霉素和阿米卡星也耐药，因为对庆大霉素耐药通常是由于 *aac*(6′)-*Ic*-*aph*(2″)-*Ia* 基因编码的双功能酶所致，该酶也同样可使肠球菌对除链霉素以外的其他氨基糖苷类抗菌药物耐药。肠球菌对链霉素耐药是由不同的耐药机制介导，因此，链霉素的耐药性必须单独检测。屎肠球菌对阿米卡星、卡那霉素、妥布霉素、奈替米星与作用于细胞壁的抗菌药物协同作用固有耐药，无须考虑体外 HLR 检测结果[117]。对庆大霉素敏感的粪肠球菌也可能因为产生其他多种氨基糖苷类抗生素钝化酶而对妥布霉素、奈替米星、卡那霉素和阿米卡星耐药[118]，但目前尚无适当的检测方法。

此外，有报道显示，下列 3 种基因编码的酶也可以介导肠球菌对庆大霉素耐药：*aph*(2″)-*Ic*[119]、*aph*(2″)-*Id*[120]和 *aph*(2″)-*Ib*[121]。携带这些基因的肠球菌对氨苄西林-庆大霉素协同作用耐药；但是携带[*aph*(2″)-*Ic*]基因的细菌仅表现为中等水平的耐药，而非高水平耐药，所以使用本章介绍的筛选方法可能无法检测。携带 *aph*(2″)-*Id* 基因的细菌，尽管使用本章所介绍的筛选方法不易检测，但如果检测结果为阳性，则认为阿米卡星无协同效应。上述酶只有用时间-杀菌试验或使用针对编码特异性酶的分子生物学检测方法才能确定它们的存在。对于任何严重的肠球菌感染（如心内膜炎），对庆大霉素和链霉素的 HLAR 筛查结果应与细胞壁活性抗菌药（青霉素、氨苄西林或万古霉素）的检测结果一起报告，因为如果任何一种药物耐药，协同作用就不存在。然而，随着高耐药肠球菌的出现，尽管青霉素、氨苄西林或万古霉素耐药，也应该报告 HLAR 结果，因为其他药物，如达托霉素与氨基糖苷类药物对 HLAR 阴性的菌株具有协同作用[122]。通过 MIC 筛选方法测定的 HLAR 无须进一步确认。纸片扩散法检测结果不确定时，应用琼脂稀释法和微量肉汤稀释法确认。

1. HLAR 琼脂稀释筛选法　依据 CLSI 操作规程，使用脑心浸液（BHI）琼脂，加入 500 μg/ml 庆大霉素或 2000 μg/ml 链霉素制备琼脂平板。取生长 18～24 h 的菌落，配制成 0.5 麦氏浓度的混悬液，取 10 μl 菌悬液点种于平板上，使最终接种量相当于每个接种点 10^6 CFU，将筛选平板在空气环境中孵育整 24 h。有大于一个菌落生长即

推测性耐药(presumptive resistance)。对于链霉素,如果在 24 h 时没有细菌生长,应该再培养 24 h。BHI 琼脂可用加 5% 羊血的 Mueller-Hinton 琼脂(MHA)或磷酸葡萄糖琼脂替代,但细菌在 BHI 琼脂上生长更好,所以首选 BHI 琼脂。商品化的琼脂筛选平板的筛选效果也很好,可以选用[123-124]。

2. HLAR 微量肉汤稀释筛选法 依据 CLSI 操作规程,肉汤稀释法可使用微量反应板的单孔或试管进行,加入含 500 μg/ml 庆大霉素或 1000 μg/ml 链霉素的 BHI 肉汤。EUCAST 推荐用 128 μg/ml 庆大霉素或 512μg/ml 链霉素检测 HLAR。按照常规微量肉汤稀释法推荐的接种量(即 5×10^5 CFU/ml)接种菌悬液,环境空气中培养 24 h,对于链霉素,如果 24 h 没有细菌生长,应再继续培养 24 h,但 EUCAST 没有此规定。有细菌生长即判读为耐药。

微量肉汤稀释筛选法中 CLSI 推荐的链霉素浓度为琼脂稀释筛选法所用浓度的 1/2。因为本试验通常包括在革兰阳性菌 MIC 测定板中,使用的菌悬液浓度为 5×10^5 CFU/ml。而在琼脂稀释筛选法中,接种物的浓度为 10^6 CFU 是微量肉汤稀释筛选法(5×10^4 CFU/0.1 ml 每孔)的 20 倍。为了用较小接种量,在同样时间内,最大限度地检出高水平链霉素耐药,有必要在微量肉汤稀释法中将推荐的链霉素浓度由 2000 μg/ml 降低到 1000 μg/ml。由于肠球菌在 MH 肉汤中生长不良,加之微量肉汤稀释筛选法接种量较少,所以 CLSI 不使用 MH 肉汤进行此试验[125]。然而,EUCAST 和其他商品化厂家仍使用 MH 肉汤检测。有关其他氨基糖苷类抗生素的微量肉汤稀释筛选法尚未进行评估研究。

3. HLAR 纸片扩散筛选法 氨基糖苷类抗菌药物高水平耐药肠球菌纸片扩散筛选法遵照第 73 章所描述的标准纸片扩散法进行[126](使用无附加成分的 MH 琼脂),使用高浓度的药敏纸片(庆大霉素 120 μg 和链霉素 300 μg[127])。同样,庆大霉素 HLAR 纸片扩散筛选时,CLSI 和 EUCAST 存在差异,其中 EUCAST 建议使用 30 μg 纸片(而不是标准的 10 μg 纸片或 CLSI-HLAR 120 μg 纸片)进行本试验。35 ℃培养 18~24 h 后测量抑菌圈。CLSI 标准为,庆大霉素或链霉素抑菌圈直径≥10 mm 为敏感,无抑菌圈表示为 HLAR。抑菌圈直径为 7~9 mm 的菌株通常显示是 HLAR,但其中有少数菌株的 MIC 仅略有增高[125]。因此,对于直径 7~9 mm 的菌株应当进一步用标准琼脂稀释法或微量肉汤稀释法测定,以判断其是敏感或是耐药。然而,HLAR 的 EUCAST 折点为:庆大霉素抑菌圈直径≥8 mm 为敏感,<8 mm 为耐药;链霉素抑菌圈直径≥14 mm 为敏感,<14 mm 为耐药。

(四)诱导型克林霉素耐药葡萄球菌和链球菌检测

虽然红霉素和克林霉素是不同类型的抗菌药物,分别属于大环内酯类和林可酰胺类,但其作用机制(抑制蛋白质的合成)和耐药机制相似。大环内酯类抗生素的耐药机制主要有两种:①外排泵机制(只针对大环内酯类耐药);②改变核糖体结合位点的甲基化酶(对两类抗菌药物均耐药)。在葡萄球菌中,对大环内酯类耐药的外排泵机制[定义为 M 型耐药(M-type resistance)]是通过 *msrA* 基因介导,而由 *erm* 基因介导(通常是 *ermA* 或 *ermC* 基因)的靶位改变可引起大环内酯类、林可酰胺类和链阳霉素 B 耐药[定义为 MLSB 型耐药(MLSB-type resistance)]。在葡萄球菌中,MLSB 型耐药可以是结构型的,也可以是诱导型的;如果是诱导型,该菌株用常规方法检测对林可酰胺(如克林霉素)敏感,但用大环内酯类抗菌药物(如红霉素)诱导后,可产生耐药。在准备选用克林霉素作为治疗药物时,确定是否存在克林霉素耐药(不论是诱导型还是结构型的)十分重要。耐药机制的详细解释可见第 71 章。

M 型耐药菌株表现为红霉素耐药,克林霉素敏感。MLSB 型耐药菌株表现为红霉素耐药,而克林霉素可能耐药也可能敏感,取决于耐药机制是结构型(constitutive)还是诱导型(inducible)。对临床分离的红霉素耐药而克林霉素敏感的菌株,确定诱导后克林霉素是耐药(由 *erm* 基因介导)还是仍为敏感(由外排泵基因介导)非常重要。鉴定链球菌的红霉素或克林霉素耐药表型及检测是否存在诱导型克林霉素耐药具有重要的意义,其鉴定原理与金黄色葡萄球菌相似。但链球菌耐药基因与葡萄球菌不同,可见于 β 溶血链球菌、肺炎链球菌和草绿色链球菌群。M 型耐

药(即红霉素耐药,克林霉素敏感)的链球菌由 *mefA* 基因介导,MLSB 型(结构型或诱导型)链球菌通常由 *ermB* 基因介导,或由 *ermTR* 基因介导(很少见)[128]。

有 2 种方法推荐用于检测葡萄球菌和链球菌的诱导型克林霉素耐药:①D 试验(D-Zone Test)(CLSI 和 EUCAST);②肉汤稀释法。肉汤稀释法是在同一个孔或试管中加入红霉素和克林霉素(CLSI 和 EUCAST)。检测方法如下。

由于地域或菌株间的差异(如医院相关 MRSA、CA-MRSA 和 CoNS),诱导型克林霉素耐药葡萄球菌的检出率差异较大,CLSI 现推荐将 D 试验阳性或在联合药敏试验孔中生长的菌株报告为克林霉素耐药[1]。尽管有研究认为,在某些情况下用克林霉素治疗诱导型耐药菌株的感染是有效的[129],但是 CLSI 仍推荐将诱导型耐药菌株报告为克林霉素耐药,并附说明"根据诱导试验的结果推测该菌株为克林霉素耐药"。EUCAST 建议附加说明"克林霉素可用于克林霉素诱导耐药菌株引起的较轻感染的短期治疗,因为在治疗过程中不一定会出现耐药"[8]。如果实验室尚未进行常规检测,应确保在临床考虑使用克林霉素治疗时有能力进行检测。尽管 β 溶血链球菌对青霉素和氨苄西林非敏感株罕见(化脓性链球菌不存在青霉素耐药菌株),无需常规进行药敏试验,但最近一项动物模型的研究表明,检测诱导型克林霉素耐药 β 溶血链球菌是有临床意义的[130],研究者建议,应该常规检测并报告诱导型克林霉素耐药链球菌。此外,CDC 也建议,对临床有需求或青霉素过敏的 B 群链球菌定植的孕妇应进行诱导型克林霉素耐药的检测[131]。

1. D 试验　使用纸片扩散法可以很容易地检测出诱导型克林霉素耐药。其方法是在 2 μg 的克林霉素纸片邻近位置放置一个 15 μg 的红霉素纸片,观察克林霉素抑菌圈是否扁平,看起来像是字母"D",因此被称为 D 抑菌圈。实验室进行该方法操作时,可在 MH 平板上与其他抗菌药物纸片一起测试,克林霉素和红霉素纸片的间隔为 15～26 mm (CLSI)[132]或 12～20 mm (EUCAST)。链球菌的 D 试验,用含 5% 羊血的 MHA 平板,两个药敏纸片放置的间距为 12 mm(CLSI)[133],或者用含脱纤维马血和 β-NAD 的 MH 平板(MH-F),两个药敏纸片放置的间距为 12～16 mm(EUCAST)。有些纸片分配器,即使两个纸片放在相邻的位置,但间距可能会>26 mm,由于两个药敏纸片的间距非常重要,而不同的纸片分配器放置的纸片距离有差异,在试验前必须对纸片间距进行校准。其中一个药敏纸片可能需要手动放置在板上,而不是使用纸片分配器。

对于不是常规做纸片扩散法药敏试验的实验室,Jorgensen 已证实,可在用于细菌纯度检测的血琼脂平板上进行 D 试验,平板的 1/3 接种细菌融合生长,平板的剩余部分用于克隆分离[133-134],方法是将葡萄球菌原菌液做 1∶250 倍稀释,制备成 0.5 麦氏单位的菌悬液,将纸片放置在细菌密集生长的区域,间距 15 mm。在近期的一项研究中,作者关注到 BBL 菌悬液快速配置器(BBL-Prompt system,BD,Sparks,MD)制备的用于药敏试验的菌悬液不能用于该试验[135]。因为,如果使用 0.5 麦氏单位浓度的菌悬液进行试验,其稀释比例不能超过 1∶20,而使用 BBL Prompt system 药敏试验的菌悬液直接接种平板,可能存在接种量不足。出现克林霉素抑菌圈平钝或截平,则 D 试验为阳性,若无截平,则 D 试验为阴性。

2. 单孔肉汤稀释法　对葡萄球菌而言,单孔肉汤稀释法需要使用微量稀释板(每个孔含量不少于 100 μl)或是试管,在同一孔(或管)中加入含有 4 μg/ml 红霉素和 0.5 μg/ml 克林霉素的阳离子调节 MH 肉汤。方法是:将 2 倍浓度的药物稀释液,即 8 μg/ml 的红霉素和 1 μg/ml 的克林霉素等体积,使药物终浓度为红霉素 4 μg/ml,克林霉素 0.5 μg/ml,然后按照常规的肉汤微量或宏量稀释法接种菌悬液到孔或管。该试验仅用于检测红霉素耐药(MIC≥8 μg/ml)而克林霉素为敏感或中介(MIC≤2 μg/ml)的葡萄球菌,试验结果解释是:有细菌生长为诱导型克林霉素耐药阳性,无细菌生长为诱导型克林霉素耐药阴性。

对链球菌而言,在微量反应板的试验孔(每孔容积不小于 100 μl)或试管中加入含 3% 裂解马血的阳离子调整的 MH 肉汤,并同时加入 1 μg/ml 红霉素和 0.5 μg/ml 克林霉素。抗菌药物混合液的准备方法是:用 2 倍浓度的药物,即 2 μg/ml 的红霉素和 1 μg/ml 的克林霉素等体积混合,取适当体积加入到微量稀释孔或试管中,使药物的终浓度为红霉素 1 μg/ml,克林霉素 0.5 μg/ml。然后在试验

孔(或试管)中按照常规的肉汤微量或宏量稀释法接种菌悬液。该试验仅用于解释红霉素耐药(MIC≥1 μg/ml)而克林霉素为敏感或中介(MIC≤0.5 μg/ml)的链球菌,有细菌生长则为诱导型克林霉素耐药,无细菌生长则无诱导型克林霉素耐药。

3. 高水平莫匹罗星耐药葡萄球菌的检测 莫匹罗星是外用抗生素,用于治疗金黄色葡萄球菌引起的皮肤感染和清除鼻腔携带菌[136]。莫匹罗星耐药可分为低水平耐药(MIC 8~256 μg/ml)和高水平耐药(MIC≥512 μg/ml)[137]。高水平莫匹罗星耐药通常由 *mupA* 基因介导,也有一些高水平莫匹罗星耐药菌株不携带 *mupA* 基因[138]。最近,在高水平莫匹罗星耐药菌株中发现了一个新的等位基因——*mupB*。预测的 MupB 蛋白与 MupA 间的同源性小,但是质粒编码的 MupB 的表达完全能够导致金黄色葡萄球菌对莫匹罗星高水平耐药[139]。有研究显示,清除高水平莫匹罗星耐药金黄色葡萄球菌的定植几乎不可能[140];是否能够清除低水平莫匹罗星耐药金黄色葡萄球菌的定植也存在争议[141]。

根据多个实验室的研究数据[138],CLSI 纳入了筛选高水平莫匹罗星耐药金黄色葡萄球菌的纸片扩散法或单孔微量肉汤稀释法。标准纸片扩散法应使用 200 μg 莫匹罗星药敏纸片,平板放置于 35℃孵育 24 h,如果没有出现抑菌圈则提示莫匹罗星高水平耐药,如果出现有抑菌圈则提示非莫匹罗星高水平耐药。微量肉汤稀释法的操作如下:取 0.1 ml 浓度为 256 μg/ml 的莫匹罗星配制液加入微孔板的试验孔,再按标准微量肉汤稀释法接种菌悬液,放置于 35℃培养 24 h。若细菌生长则提示莫匹罗星高水平耐药,不生长则为非莫匹罗星高水平耐药。

仅适用于鼻腔去定植的 EUCAST 标准:莫匹罗星折点为≤1 mg/L 为敏感,>256 mg/L 为耐药。纸片扩散法,使用 200 μg 莫匹罗星纸片,折点为≥30 mm 和<18 mm。莫匹罗星中介的菌株在短期治疗时仍可以使用莫匹罗星治疗,如术前,但是,长期根除率却较低。

三、革兰阴性菌耐药表型检测

革兰阴性杆菌对抗菌药物耐药,特别是对 β 内酰胺类抗生素的耐药已经引起了全世界关注。越来越多的细菌出现对最后一道防线的碳青霉烯类和黏菌素耐药,导致了多重耐药菌以及泛耐药菌的出现,耐药形势日益严峻[142]。在患者的全程医疗过程中使用有效的抗菌药物进行治疗,防止耐药菌的播散是关注的重点。使用可靠的试验方法检测细菌的耐药性对指导合理治疗以及感染控制十分重要[143]。本章介绍了多种用于检测纯培养菌或直接临床标本的表型试验方法,来检测革兰阴性杆菌对 β 内酰胺、氟喹诺酮和黏菌素的耐药机制。

革兰阴性菌 β 内酰胺耐药表型检测

革兰阴性杆菌对 β 内酰胺类抗生素的耐药性不是一个简单的问题。耐药机制多样,可以是固有的或获得性的,也可以通过诱导使低水平耐药发展到高水平,可以通过克隆传播,也可以通过耐药基因水平传播。因为 β 内酰胺酶的产生是主要耐药机制,所以产 β 内酰胺酶菌尤其值得关注,并且 β 内酰胺酶基因在可移动遗传元件(质粒、转座子、插入元件)上,容易在革兰阴性菌之间传播[144]。

临床实验室进行 β 内酰胺酶的检测有两个目的。第一,检测潜在的耐药机制来指导治疗;第二,检测具有流行病学重要意义的耐药机制。这两个目的并不是相互独立的,识别 β 内酰胺酶是感染控制关注的重点。然而,使用特殊试验检测 β 内酰胺酶并不意味着 β 内酰胺酶检测能够预测治疗结果。例如,淋病奈瑟菌 β 内酰胺酶试验阳性仅意味着细菌对青霉素耐药,青霉素不能用于临床治疗[1]。β 内酰胺酶试验有助于指导革兰阴性菌的治疗,清单见表 75-2(见青霉素酶一行)。相反,CLSI 推荐的 ESBLs 和碳青霉烯酶检测方法多用于明确对流行病学调查和感染控制有意义的细菌耐药机制。但是,最近 CLSI 修订了头孢菌素类和碳青霉烯类抗菌药物药敏折点,已不再建议使用该试验预测头孢菌素和碳青霉烯类药物的治疗效果[1]。CLSI 建议实验室根据常规药敏试验结果并应用修订后的解释标准。表 75-2 总结了本章所讨论的检测革兰阴性杆菌的 β 内酰胺酶的各种补充表型试验。

1. 需氧和厌氧革兰阴性菌的青霉素酶检测 青霉素酶导致青霉素酶不稳定的青霉素类抗菌药物耐药,包括阿莫西林、氨苄西林、阿洛西林、羧苄

青霉素、美洛西林、哌拉西林和替卡西林。在直接β内酰胺酶试验中，阳性表示细菌对β内酰胺类抗菌药物耐药，但阴性则不一定表示敏感，因为可能存在其他β内酰胺类抗生素耐药机制。例如，直接β内酰胺酶试验可以检测出大多数氨苄西林耐药流感嗜血杆菌所产生的β内酰胺酶。然而，氨苄西林耐药β内酰胺酶阴性的菌株越来越多[145-146]，这些菌株只能通过常规纸片扩散或稀释法检测(第 73 章)。

CLSI 认可使用直接β内酰胺酶试验来预测青霉素酶不稳定型青霉素类抗菌药的敏感性，以便比传统 AST 方法更早地提供以下革兰阴性菌的临床重要信息。包括：流感嗜血杆菌，HACEK 组(嗜血杆菌属，伴放线杆菌，人心脏杆菌、侵蚀艾肯菌和金杆菌属)、卡他莫拉菌、淋病奈瑟菌和巴斯德菌属(表 75-2，青霉素酶一行)。EUCAST 指南建议对金氏金杆菌、卡他莫拉菌和淋病奈瑟菌进行β内酰胺酶检测[8]。对于流感嗜血杆菌，EUCAST 建议使用 1 U 的苄青霉素(青霉素 G)纸片筛查β内酰胺耐药性。如果直径≥12 mm，报告为敏感，而如果直径<12 mm，则必须检测β内酰胺酶，当β内酰胺酶阳性，则氨苄西林、阿莫西林和哌拉西林报告为耐药。对于其他β内酰胺类抗菌药或β内酰胺酶阴性时，必须通过常规方法检测特定的β内酰胺类抗菌药敏感性[8]。

CLSI 指南建议对脆弱拟杆菌群以外的厌氧革兰阴性杆菌进行β内酰胺酶检测[1]。脆弱拟杆菌群不需要进行β内酰胺酶检测，因为这群细菌通常均产β内酰胺酶，并且对青霉素耐药。与需氧菌一样，厌氧菌对β内酰胺类药物的耐药性并不总是通过β内酰胺酶介导的(如迪氏副拟杆菌(*Parabacteroides distasonis*)和脆弱拟杆菌(*B. fragilis*))[1, 147-148]。

2. 肠杆菌科菌超广谱β内酰胺酶的检测 ESBL 是一类能水解大多数青霉素类、单酰胺环类和头孢菌素类抗菌药物(包括窄谱和广谱的头孢菌素)的酶，但是不能水解头霉素和碳青霉烯类[149-150]。传统的β内酰胺酶抑制剂可以抑制酶的活性[5]，如克拉维酸(clavulanic acid)、他唑巴坦(tazobactam)、舒巴坦(sulbactam)，以及新型抑制剂阿维巴坦(avibactam)。最常见的 ESBLs 是 CTX-M、SHV 及 TEM 型，它们在体外表现出不同的抗菌药药敏谱[149-150](http://www.lahey.org/Studies/)。尽管所有的超广谱β内酰胺酶都可以水解广谱头孢菌素类抗生素，但是根据所产生的酶的种类不同，水解三代头孢菌素的活性也不同。例如，一些 TEM 和 SHV 型 ESBLs 水解头孢他啶的能力强于头孢曲松，CTX-M 酶型 ESBL 对头孢曲松和头孢噻肟的水解活性比对头孢他啶更强[150-151]。超广谱β内酰胺酶不水解碳青霉烯类，因此碳青霉烯类抗菌药物可以用于治疗产 ESBL 细菌的重症感染。超广谱β内酰胺酶已经在第 71 章中讨论。

近年来，由于头孢菌素和氨曲南的药敏解释标准或折点下调和 ESBL 试验的局限性[1, 8]，CLSI 和 EUCAST 对 ESBLs 的筛选和确证试验进行了修订。新的折点基于药动学/药效学数据和有限的临床转归资料，其目的是为了在应用常规剂量头孢菌素治疗时能更准确地预测其治疗效果。在应用当前折点的情况下，ESBL 筛选和确证试验的目的主要是用于感染控制和流行病学调查，而不是修改药敏结果(例如，将头孢菌素药敏结果从敏感修改为耐药)。

CLSI 指南介绍了肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、大肠埃希菌和奇异变形杆菌的 ESBLs 筛选和确证试验[1]；EUCAST 指南中还包括了拉乌尔菌属、沙门菌属和志贺菌属(EUCAST 定义为 Group1，第一群生物体)[5]。尽管，除了这些细菌之外，其他细菌也能产生超广谱β内酰胺酶，但是不被克拉维酸抑制的 AmpC 酶的存在会导致 ESBLs 的表型检测出现假阴性[152]，因此在含有染色体编码的产 AmpC 酶的细菌(例如，肠杆菌属和沙雷菌属)中进行 ESBL 的确认试验是困难的。尽管如此，EUCAST 建立了一种 ESBL 的确证方法，可以检测携带诱导性染色体 AmpC 的肠杆菌科是否产 ESBL，具体描述如下。

CLSI 指南中，ESBL 筛选试验是基于一种或多种头孢菌素和(或)氨曲南的 MIC(或纸片扩散法)界值，氨曲南、头孢噻肟、头孢他啶、头孢曲松和(或)头孢泊肟 MIC≥2 μg/ml，而奇异变形杆菌头孢泊肟 MIC≥8 μg/ml[1, 8]。因为酶的表达水平和水解活性不同，可能会导致产 ESBL 的临床分离株一种或多种筛选药物的 MICs 升高[150]。因此，当使用一种以上的筛选药物可增加筛选试验的敏感性[153]。如果筛选试验结果为阳性，则需要进行 ESBL 确认试验。

表 75-2 产β内酰胺酶革兰阴性杆菌表型检测方法

β内酰胺酶	水解谱[a]	抑制剂	检测方法	测试菌种	报告	注释
青霉素酶	青霉素酶不稳定的青霉素类，包括阿莫西林、氨苄西林、阿洛西林、羧苄青霉素、美洛西林、哌拉西林、替卡西林	传统的β内酰胺酶抑制剂：克拉维酸、舒巴坦、他唑巴坦 新型β内酰胺酶抑制剂：阿维巴坦、vaborbactam、relebactam	直接β内酰胺酶测试，包括头孢菌素显色法，酸度计和碘量测试	CLSI：流感嗜血杆菌、HACKE群[b]，卡他莫拉菌、淋病奈瑟菌，巴斯特菌属 EUCAST：金氏金杆菌，卡他莫拉菌和淋病奈瑟菌	β内酰胺酶阳性菌株必须报告对青霉素酶不稳定的青霉素类耐药	阴性结果表示不确定性，因为可能存在其他耐药机制，必须进行传统的药物敏感性试验确认药物敏感性
A类ESBL，例如CTX-M，TEM（非TEM-1或-2），SHV（非SHV-1）	青霉素、头孢菌素、单酰胺环类、不水解头霉素类或碳青霉烯类	传统的β内酰胺酶抑制剂：克拉维酸、舒巴坦、他唑巴坦 新型β内酰胺酶抑制剂：阿维巴坦、vaborbactam、relebactam	头孢菌素＋/－克拉维酸试验：宏量肉汤稀释法，纸片扩散法，梯度扩散法，双纸片协同试验 比色法：快速ESBL NDP，快速ESBL筛选，β内酰胺试验	CLSI：克雷伯菌属，大肠埃希菌和奇异变形杆菌 EUCAST：鉴别细菌是否有可诱导染色体AmpC β内酰胺酶 群体1：CLSI指定细菌和拉乌尔菌属，沙门菌属和志贺菌属 群体2：携带可诱导染色体AmpC β内酰胺酶的肠杆菌科细菌	按CLSI 2010年之后版本的折点，只需报告头孢菌素的MIC值 ESBL试验仅用于流行病学调查和感染控制	许多实验室仍在进行ESBL筛查试验和确证试验，因为革兰阴性杆菌药敏试验板上内置了这些试验
染色体或质粒介导的AmpC β内酰胺酶	青霉素类、头孢菌素（不含四代头孢）、头霉素类和单酰胺环类；不水解头孢吡肟	传统的β内酰胺酶抑制剂抑制效果不佳，尤其克拉维酸； 硼酸和氯唑西林 新型β内酰胺酶抑制剂：阿维巴坦、vaborbactam、relebactam	头孢西丁或1个3代头孢＋/－氯唑西林或硼酸	CLSI不认可任何检测AmpC β内酰胺酶试验 EUCAST：大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌、沙门菌属和志贺菌属	报告头孢菌素MICs 试验仅用于流行病学调查和感染控制	AmpC β内酰胺酶试验无法鉴别染色体或质粒介导
A类碳青霉烯酶，例如KPC、SEM、GES	水解青霉素类、头孢菌素、单酰胺环类，以及不同程度水解碳青霉烯酶	硼酸＋/－克拉维酸 新型β内酰胺酶抑制剂：阿维巴坦、vaborbactam、relebactam	显色Carba NP试验和衍生产品，Mcim，MALDI-TOF质谱水解法，UV色谱法，LC-MS/MS，BYG-carba试验，免疫层析法	碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌和铜绿假单胞菌 检测鲍曼不动杆菌的碳青霉烯耐药不可靠	按CLSI 2010年之后版本的折点，只需报告碳青霉烯类的MIC值。试验仅用于流行病学调查和感染控制	

（续　表）

β内酰胺酶	水解谱[a]	抑制剂	检测方法	测试菌种	报告	注释
B类金属-β内酰胺酶，例如 NDM、VIM、IMP	水解青霉素类、头孢菌素，以及不同程度水解碳青霉烯酶、不水解单酰胺环类	二价阳离子螯合剂：吡啶酸、EDTA	EDTA 抑制法，如宏量肉汤稀释法、纸片扩散法、梯度扩散法、和 EDTA-mCIM			产MBL 倾向于对所有被检测的β内酰胺类药物产生高水平的耐药性，单酰胺环类除外（在没有其他机制的情况下）
D类 OXA-型β内酰胺酶 OXA-48 like 酶在肠杆菌科报告越来越多 鲍曼不动杆菌 OXA-23，OXA-24/40，OXA-51OXA-58，和 OXA-143	水解青霉素类、单酰胺环类，以及不同程度水解碳青霉烯酶；不水解三代头孢	没有D类β内酰胺酶的有效抑制剂 新型β内酰胺酶抑制剂：阿维巴坦对 OXA-48 like 类酶有活性	其他抑制剂（如硼酸、氯唑西林、EDTA 等）对鉴定其他类型的β内酰胺酶和耐药性没有抑制作用			在缺乏其他抗性机制的情况下，OXA-48 like 酶可能很难被检测到，因为它们可能对第三代头孢菌素敏感，仅碳青霉烯类 MICs 轻度增高

注：[a] 每一类酶中，因酶类型不同水解谱有轻微变化；[b] HACEK 群：凝聚杆菌属（以前指嗜沫嗜血杆菌、惰性嗜血杆菌和伴放线放线杆菌）、心杆菌属、啮蚀艾肯菌和金氏金杆菌

ESBL 活性可以被克拉维酸抑制，这一特性常被用于确认 ESBL 的产生（表 75-2）。这些检测是基于头孢菌素（通常是头孢他啶、头孢噻肟或头孢吡肟）与克拉维酸共同作用后其抗菌活性比单独使用头孢菌素时增加。CLSI 和 EUCAST 指南中，纸片扩散法和微量肉汤稀释法都可以作为不表达诱导型 AmpC 酶的肠杆菌科细菌的 ESBL 确证实验[1,5]。微量肉汤稀释法，需要在加或不加 4 μg/ml 的克拉维酸的情况下分别测定头孢噻肟和头孢他啶的 MIC。当加入克拉维酸后抗菌药物的 MIC 比不加克拉维酸下降≥3 个稀释度，表明 ESBL 阳性。纸片扩散法是使用加或不加 10 μg 克拉维酸的药敏纸片进行检测，在加克拉维酸后抑菌圈直径比不加克拉维酸的抑菌圈直径增加≥5 mm 时，表明 ESBL 阳性[1,8]。EUCAST 还阐述了一种与宏量肉汤稀释法（broth macrodilution，BMD）相似的梯度 MIC 法[如 Etest 或 MIC 测试条（Liofilchem，Italy）]，和一种双纸片协同试验。双纸片协同试验指头孢菌素纸片贴在含克拉维酸的纸片（如阿莫西林-克拉维酸）旁边，当头孢菌素纸片与含克拉维酸的纸片发生协同效应，即抗菌药物纸片的抑菌圈向抑制药纸片方向变大，判断为阳性。

对于产生染色体介导的、诱导性的 AmpC 型 β 内酰胺酶的肠杆菌科（定义为 Group2，第 2 组生物体），EUCAST 建议使用头孢吡肟加上或不加克拉维酸作为检测 ESBL 的选择方案，因为头孢吡肟对 AmpC 水解稳定[5]。大多数实验室依靠商业自动化的 AST 系统来检测 ESBL，因为常规测试卡上有 ESBL 筛选和确认的测试。在很大程度上，这些系统能检出 ESBL，但是 FDA 没有批准用于奇异变异杆菌的 ESBL 检测，因为其检测性能不佳[154-157]。实验室如果使用自动化系统检测 ESBL，报告 ESBL 时可以考虑增加其他确认测试。

造成菌株筛选试验阳性而确证试验阴性的原因很多，这些菌株可能是 ESBL 阴性菌株因以下机制对筛选药物的敏感性降低：膜孔蛋白减少；高产广谱 β 内酰胺酶，如 TEM-1 和 SHV-1 酶；产其他头孢菌素酶，如 AmpC 酶（这些酶的活性不能被克拉维酸所抑制）。这些菌株也可能是 ESBL 阳性菌株，但同时还产生其他的 β 内酰胺酶，如 AmpC 酶，可干扰 ESBL 抑制药克拉维酸的抑制作用[152,158]。加入 AmpC 酶的抑制药（如氯唑西林）可以提高产 AmpC 酶的 ESBL 菌株检测敏感性[159]，这个试验的另一个做法是，在含有氯唑西林（AmpC 酶抑制药）的 MH 琼脂上使用相同的纸片扩散法和解释标准进行 ESBL 检测，可以提高具有产 ESBLs 和 AmpC 双重耐药机制的 ESBL 菌株检出率[160]。

最近，已开发出 3 种快速比色法检测产 ESBL 的肠杆菌科细菌，包括快速 ESBL NDP、快速 ESBL 筛查（Rosco-Diagnostica A/S，Tasstrup，丹麦）和 βLacta 检测（Bio-Rad，Marnes La Coquette，法国）。ESBL NDP 检测原理是，当他唑巴坦在与不在时，pH 指示剂酚红检测头孢噻肟水解。如果细菌产 ESBL，则水解头孢噻肟形成羧基，会导致从红色到橙色/黄色的颜色变化；而他唑巴坦抑制 ESBL 的活性，所以没有明显颜色变化（保持红色）[161]。该方法已用于检测纯培养细菌，20 min 内可获得结果，敏感性为 93%～95%，特异性为 100%[161-162]。该方法也适用于直接从尿[163]和血培养阳性瓶[161,164]检测 ESBL。快速 ESBL-NDP 试验的商业版本，即快速 ESBL 筛选，也已开发出来，采用可溶解片剂形式的冻干试剂（即 diatabs）。但据报道，其性能不如快速 ESBL-NDP，孵育 2 h 后的敏感性为 92%，特异性为 83%[162]。βLacta 试验是一种快速的方法，其原理是产 ESBL、AmpC β 内酰胺酶和大多数碳青霉烯酶的细菌裂解黄色头孢菌素（HMRZ-86），在 15 min 内呈现红色。该方法检测纯培养细菌 ESBL 的敏感性为 88%～95%，特异性为 71%～95%[162,165-166]，也可直接用于尿[167-168]、支气管抽吸物[169]和血培养阳性瓶[170]。该方法对产 AmpC 菌，检测的敏感性不定，各研究结果不一致。因为该方法不能区分 ESBL、AmpC 和碳青霉烯酶[162,165-166]。

3. 产 ESBL 革兰阴性菌定植检测 含三代头孢菌素的肉汤增菌和直接选择性培养（MacConkey 琼脂或 Drigalski 琼脂）已用于定植筛查产 ESBL 革兰阴性菌[171]。此外，各种显色培养基结合显色底物和第三代头孢菌素选择性来预测产 ESBL 细菌。显色培养基中常使用头孢泊肟，因为它比其他头孢菌素更敏感[171-173]。产 ESBL 细菌检测的敏感性增高的同时会影响其特异性，因为产 AmpC 和 K1 β 内酰胺酶细菌也能在这些培养基上生长和被检测到[173]。不同

培养基检测直肠标本定植的敏感性和特异性因研究而异[174-175]。一项研究以 ICU 2337 例直肠拭子（ESBL 阳性 354 例）为研究对象，比较 CHROMagar ESBL（CHROMagar，法国），ChromID ESBL（BioMérieux，法国），Brilliance ESBL（赛默飞诊断，美国）和 BD DrigalSkI 与头孢噻肟的敏感性和特异性，敏感性和特异性分别为 96%～98% 和 58%～72%。产 AmpC 和非发酵菌的影响试验的特异性，主要是铜绿假单胞菌对头孢噻肟天然耐药[175]。

4. 检测革兰阴性杆菌质粒介导的 AmpC 型 β 内酰胺酶　编码可诱导的 AmpC 型 β 内酰胺酶的基因位于一些革兰阴性菌的染色体上，如 SPACE（黏质沙雷菌、铜绿假单胞菌、不动杆菌属、费劳地枸橼酸杆菌和阴沟肠杆菌）。ESCPM 是编码可诱导性 AmpC 型 β 内酰胺酶的肠杆菌科细菌，包括阴沟肠杆菌、黏质沙雷菌、弗劳地柠檬酸杆菌、普罗威登菌属、普通变形杆菌和摩根菌属[176]。AmpC 酶导致青霉素类、广谱头孢菌素（不包括头孢吡肟）、头霉素类和单酰胺环类耐药，但是不能水解碳青霉烯类（第 71 章）。AmpC 型 β 内酰胺酶不能被常用的 β 内酰胺酶抑制药（尤其是克拉维酸）所抑制，能被硼酸和氯唑西林很好地抑制。AmpC 型酶能水解头霉素类、不水解头孢吡肟及不被克拉维酸抑制，这些特点有助于与产 ESBL 细菌区别。大肠埃希菌、克雷伯菌属、沙门菌属和奇异变形杆菌等不产生染色体介导的、可诱导的 AmpC 型 β 内酰胺酶，但含有可传递的质粒介导的 AmpC 型 β 内酰胺酶[177]。与质粒编码的 ESBLs 类似，质粒介导的 AmpC 型 β 内酰胺酶通常表现多重耐药。AmpC 酶加之膜孔蛋白丢失可导致细菌对碳青霉烯类耐药[178]。以下所描述的 AmpC 酶的表型检测试验并不能区分基因是位于染色体还是位于质粒上。如果从不携带染色体介导的 AmpC 基因的肠杆菌科细菌中检出 AmpC 酶通常就认为是质粒介导的。对染色体上携带有 AmpC 基因，但通常不表达的大肠埃希菌和志贺菌属必须应用分子生物学方法区别酶基因是来源于质粒还是染色体。大肠埃希菌和志贺菌染色体 AmpC 基因启动子和（或）衰减子区域的突变可能导致 AmpC 高表达[179]。鉴别质粒介导的 AmpC 酶对感染控制和流行病学调查是有帮助的[180-181]，故大多数评价 AmpC 酶检测方法的研究也都集中在质粒介导 AmpC 酶的检测[182]。

目前已报道有几种检测 AmpC 酶介导耐药的方法。将 AmpC 酶抑制药加入到其中一种 AmpC 酶确认试验中被认为是比较可行的方法，介绍如下：尽管所有的抑制药均被用于 AmpC 酶检测试验评价，但氯唑西林（cloxacillin）和硼酸（boronic acid）是研究最为广泛的 2 种抑制药[183]。值得注意的是，硼酸并非是 AmpC 酶的特异性抑制药，它可以抑制 A 类酶（如 KPC）和 C 类酶（如 AmpC），因此在应用硼酸进行检测时，还需要使用其他辅助试验对这两类酶进行区别[184-185]。

AmpC 酶的表型检测通常用于 AmpC 酶筛选试验阳性的菌株，头霉素（如头孢西丁、头孢替坦）不敏感可用于对潜在产 AmpC 酶菌株进行筛选。头孢替坦耐药对于检测产 AmpC 酶菌株有较高的特异性，而头孢西丁有更高的敏感性[186-188]。值得注意的是，头孢西丁的耐药可以通过孔蛋白突变介导[179]。另有研究表明，对头孢西丁和头孢他啶（或头孢噻肟）联合耐药可以提高试验的特异性且不降低其敏感性[189-190]。当头霉素没有测试时，头孢吡肟敏感与头孢噻肟和（或）头孢他啶耐药也可以联合用于判断结果，但特异性欠佳。EUCAST 建议头孢西丁 MIC>8 μg/ml，与头孢他啶和（或）头孢噻肟 MIC>1 μg/ml 作为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌、沙门菌属和志贺菌属的 AmpC 筛选。筛选出的产 AmpC 酶阳性菌株可以通过分子生物学方法（第 79 章）或一种表型检测方法进行确认。EUCAST 建议使用氯唑西林协同试验等确认试验检测上述细菌的质粒介导 AmpC，如果大肠埃希菌/志贺菌呈阳性，则需要进一步的 PCR 检测来区分质粒介导 AmpC 和染色体 AmpC。CLSI 没有规范产 AmpC 的筛选和确认试验。

双纸片协同试验被广泛应用于检测质粒和染色体介导的产 AmpC 酶细菌。该试验在密集接种细菌的平板进行，将含有一种抗菌药物（通常为头孢西丁、头孢他啶或头孢噻肟）的纸片放置在含有 AmpC 酶抑制药纸片（通常为氯唑西林或硼酸）附近。抑制药可以灭活 β 内酰胺酶，导致抗菌药物纸片的抑菌圈向抑制药纸片方向变大[191]。很多研究已经证实，尽管该方法的特异性并不理想，但具有良好的敏感性（85%～96%）[190,192-193]。Ruppé 等对该试验进行改良，使用苯唑西林作为

抑制剂(译者注:已经核对原文[191],此处苯唑西林有误),可以用于检测 AAC-1 型 β 内酰胺酶。实际上,这种双纸片协同试验可使用头孢他啶和头孢噻肟进行两组试验,一组使用氯唑西林作为抑制药,另一组使用头孢西丁作为抑制剂。细菌所产的 AAC-1 酶可以被两组抑制剂抑制,而其他的 AmpC 型 β 内酰胺酶只能被氯唑西林抑制[191]。

另一种实验是在标准纸片扩散法药敏试验中使用组合药敏纸片,该纸片包含一个试验药物(通常为头孢西丁,也可以是头孢噻肟或头孢他啶)和一种 AmpC 酶抑制药(氯唑西林或硼酸)。与单独试验药物比较,有抑制剂存在情况下,抑菌圈直径增加(通常≥4 mm)被认为是阳性[192,194]。大量研究评价了不同的 β 内酰胺类药物和抑制剂的组合,结果表明,每一种组合对于检测染色体和质粒介导的 AmpC 酶都具有良好的敏感性和特异性[186-188,192,194]。研究表明氯唑西林或硼酸均具有良好的性能,但两者与头孢西丁联合应用比一种抑制剂单独应用效果更好[194]。

基于上述介绍的各种检测方法至少有 3 个生产商已经开发了测试系统。Rosco NeoSensitabs (敏感性为 96%,特异性为 92%[192])和 Mast AmpC Detection (敏感性为 96%,特异性为 92%[195])组合几种纸片到板条中,可用于检测几种 β 内酰胺酶耐药机制。已发表的有限数量的研究表明这些方法有良好的性能[186,192]。bioMérieux 公司开发的 E-test AmpC assay (Etest AmpC)也可利用类似的原理检测 AmpC 酶,敏感性为 84%~93%,特异性为 70%~100%。Etest AmpC 使用双端试条,一端含有梯度的头孢替坦,另一端含有梯度的头孢替坦加氯唑西林;结果单独头孢替坦的 MIC 与头孢替坦联合抑制药的 MIC 比值≥8 为阳性,形成一个变形的椭圆形抑菌圈或幻影(phantom)抑菌圈(http://www.ilexmedical.com/files/E-test-Package-Insert/Product_ supplement.pdf)。

5. 检测革兰阴性杆菌碳青霉烯酶 碳青霉烯类抗菌药物是广谱 β 内酰胺类药物,可用于治疗严重感染和多重耐药菌引起的感染,所以被视为“最后一道防线”。碳青霉烯类耐药是一个严重的临床和公共卫生问题。革兰阴性菌有多种碳青霉烯类耐药机制,但主要分为两大类:产碳青霉烯酶(carbapenemase-producing,CP)和非产碳青霉烯酶(non-carbapenemaseproducing,non-CP)机制。对于后者,碳青霉烯类抗菌药物的耐药性是通过孔蛋白突变或外排泵介导的,或者这些突变或外排泵与 ESBL 和(或)AmpC 联合发挥作用,不同的革兰阴性菌耐药机制不同。表 75-3 列举了革兰阴性杆菌的碳青霉烯类耐药机制。

表 75-3 革兰阴性杆菌碳青霉烯耐药机制的首字母缩写总结表

名称	首字母缩写	定义	细菌	实验室鉴定	碳青霉烯耐药机制
碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌	CRE	包含肠杆菌科中碳青霉烯耐药的细菌,无论何种耐药机制	肠杆菌科细菌(包括大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌)	依据当前 CLSI 折点,判断碳青霉烯纸片扩散法和 MIC 法结果“耐药 R”[a]	包括所有碳青霉烯耐药机制(如产 AmpC 或 ESBL 合并膜通透性改变或产碳青霉烯酶)
产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌	CPE CP-CRE	包含产碳青霉烯酶介导的碳青霉烯耐药的肠杆菌科细菌	肠杆菌科细菌(包括大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌)	碳青霉烯酶试验阳性[b]	产碳青霉烯酶(如 KPC、NDM、OXA-48 like)
非产碳青霉烯酶碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌	Non-CP-CRE	包含肠杆菌科中碳青霉烯耐药的细菌,不包括产碳青霉烯酶耐药机制(排除产碳青霉烯酶细菌)	肠杆菌科细菌(包括大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌)	碳青霉烯酶试验阴性	产 AmpC 或 ESBL 合并膜通透性改变,由于膜孔蛋白突变或外排泵
碳青霉烯耐药细菌	CRO	包含所有碳青霉烯耐药的革兰阴性杆菌,包括肠杆菌科细菌,无论何种耐药机制	所有革兰阴性杆菌,包括肠杆菌科细菌、非发酵阴性杆菌(如铜绿假单胞菌和不动杆菌属)及其他(如气单胞菌属)	依据当前 CLSI 折点,判断碳青霉烯纸片扩散法和 MIC 法结果“耐药 R”	包括所有碳青霉烯耐药机制

（续　表）

名称	首字母缩写	定义	细菌	实验室鉴定	碳青霉烯耐药机制
产碳青霉烯酶细菌	CPO CP-CRO	包含所有产碳青霉烯酶介导的碳青霉烯耐药革兰阴性杆菌，包括肠杆菌科细菌	所有革兰阴性杆菌，包括肠杆菌科细菌、非发酵阴性杆菌（如铜绿假单胞菌和不动杆菌属）和其他（如气单胞菌属）	碳青霉烯酶试验阳性	产碳青霉烯酶（如 KPC、NDM、OXA-48 like）
非产碳青霉烯酶碳青霉烯耐药革兰阴性杆菌	Non-CP-CRO	包含碳青霉烯耐药的革兰阴性杆菌，不包括产碳青霉烯酶耐药机制（排除产碳青霉烯酶细菌）	所有革兰阴性杆菌，包括肠杆菌科细菌、非发酵阴性杆菌（如铜绿假单胞菌和不动杆菌属）和其他（如气单胞菌属）	碳青霉烯酶试验阴性	含非碳青霉烯酶介导的碳青霉烯耐药机制，包括由于膜孔蛋白突变或外排泵过度表达导致的膜通透性下降；产 AmpC 或 ESBL 合并膜通透性改变；青霉素结合蛋白改变（罕见）

注：[a] 厄他培南（仅限肠杆菌科细菌）、多利培南、亚胺培南和（或）美罗培南耐药“R”；[b] 碳青霉烯酶测试包括表型（如本章介绍）和分子生物学方法（第 79 章）。碳青霉烯酶的分子检测只能纳入或排除与基因靶点相关的碳青霉烯酶

碳青霉烯酶是一种能水解碳青霉烯类抗菌药物（如厄他培南、多尼培南、亚胺培南和美罗培南）的β内酰胺酶。通常情况下，碳青霉烯酶也可以水解β内酰胺类抗菌药物，如青霉素类、β内酰胺类/酶抑制复合制剂、单酰胺环类［除了金属β内酰胺酶（metallo-β-lactamases，MBL）］和头孢菌素类等（OXA 型β内酰胺酶不能有效水解广谱头孢菌素类），所以产碳青霉烯酶菌株对所有β内酰胺药物均耐药。新的 BL/BLI 组合，如头孢他啶-阿维巴坦、美罗培南-瓦博巴坦（vaborbactam）和亚胺培南-雷巴坦（relebactam），对产 A 类丝氨酸碳青霉烯酶具有良好的活性，但对产金属酶 MBL 无效[196-197]。头孢他啶-阿维巴坦对产 D 类 OXA-48like 酶的肠杆菌科细菌也有抑制作用[198]。尽管碳青霉烯酶可以由染色体基因编码，但是大部分情况下是由携带多种耐药基因的质粒所介导的。

碳青霉烯酶是导致革兰阴性菌对碳青霉烯类抗生素耐药性增加的主要机制，而且产碳青霉烯酶革兰阴性菌（CP-CRO）引起的感染显现高发病率和死亡率[199-202]。由于碳青霉烯酶这一特征，所以鉴定具有该耐药机制的菌株对感染控制具有重要意义。在医院环境中检测 CP-CRO 可以保障实施比非 CP-CRO 更严格的感染控制策略。此外，随着越来越多具有抗 CRO 活性的新型抗菌药物的问世，CP-CRO 与非 CP-CRO 的鉴别越来越重要，将有益于抗菌药物管理，优先使用这些新药物治疗 CP-CRO 感染，如上文讨论的新 BL/BLI 组合[203]。

碳青霉烯酶包括以下 3 类β内酰胺酶：A 类酶，包括 KPC、SME、IMI、NMC、GES；B 类酶，又称为金属β内酰胺酶（metallo-β-lactamase，MBL），其中 NDM、VIM 和 IMP 是最常见的类型；D 类 OXA 酶[204, 206]，这些酶在第 71 章中已有描述。碳青霉烯酶已在许多不同的革兰阴性杆菌中被发现，但最近在肠杆菌科细菌中发现了碳青霉烯酶使临床问题更加严峻。在美国 KPC 酶是最常见的 A 类碳青霉烯酶，通常存在于肠杆菌科细菌中，但在假单胞菌中也有发现[205-206]。过去，MBL 通常在铜绿假单胞菌和不动杆菌属中检出，偶尔在肠杆菌科细菌中检出[207]。与其他 MBL 不同，NDM 虽然也可在不动杆菌属、假单胞菌属和嗜麦芽窄食单胞菌中检出，但主要在肠杆菌科细菌中出现[208-210]，且仅数年它已在几大洲的多个国家中报道[209-210]。OXA 型碳青霉烯酶通常出现在不动杆菌中，但现在欧洲和美国，产 OXA-48 like 肠杆菌科细菌增长最快[211-212]（https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/trackingcre.html）。产 OXA-48 like 肠杆菌科特别值得关注，因为其对抗菌药物敏感，易被漏检。如果缺乏其他抗β内酰胺耐药机制，OXA-48 like 酶可以高水平水解青霉素，低水平水解碳青霉烯类药物，对广谱头孢菌素无作用[212]。

2010 年 1 月，CLSI 降低了碳青霉烯类抗菌药物折点，碳青霉烯类 MICs 增高的分离菌株不再建议常规检测碳青霉烯酶，同时对产碳青霉烯酶菌

株不需要修订解释标准。如果执行了 2010 年碳青霉烯类抗生素新折点，则不再需要进行常规检测，但是为了抗菌药物管理、感染控制或流行病学调查目的，实验室可以选择检测产碳青霉烯酶菌株。产碳青霉烯酶菌的表型检测方法有许多种。改良霍奇金试验(modified Hodge test，MHT)是最早推荐的方法，但被 2018 年 CLSI 指南删除了。CLSI 和 EUCAST 认可了一些性能更佳的新方法，如 Carba NP 和改良碳青霉烯失活法(modified carbapenem inactivation method，mCIM)[1, 5]。尽管 MHT 很容易操作，缺点是结果判读存在主观性，MBL 的检测敏感性低，缺乏特异性，对于一些产 AmpC 酶或 ESBLs 的细菌，当膜孔蛋白突变共同存在时，检测结果往往会出现假阳性(请参阅本手册以前的版本以进一步了解 MHT)[213-215]。

EUCAST 和 CLSI 分别在 2013 年和 2015 年批准了 Carba NP 方法检测肠杆菌科、铜绿假单胞菌和不动菌属的碳青霉烯酶[216]。该方法原理是通过 pH 敏感的指示剂酚红检测被碳青霉烯酶水解的亚胺培南产物，随着酸的产生，红色变为橘色或黄色[4]。多项研究表明，它在肠杆菌科和铜绿假单胞菌中检测很多不同类型的碳青霉烯酶具有很好的敏感性和特异性[217-219]，但是对 GES 和 OXA-48 like 型碳青霉烯酶及黏液性分离株的检测效果并不理想[220]。Carba NP 方法廉价，快速(30 min ～ 2 h)，易操作，当天就能报告结果[4, 219-220]。但是该方法的缺点是实验室必须自行配制试剂，亚胺培南试剂有效期是 3 天，如果亚胺培南耐药比较少见时，就会很浪费试剂，而且增加了试验的复杂性。同时，结果判读颜色时，主观性较大，尤其当轻微的颜色变化时。最近许多研究表明 Carba NP 对鲍曼不动杆菌的检测效果不好，因此，2018 年 CLSI 删除了 Carba NP 用于鲍曼不动杆菌的建议[217, 221]。至今，出现了许多 Carba NP 的衍生物，包括不同的接种物和提取试剂，以及改良起始 pH，不同的 pH 指示剂和检测时间[219, 222-223]。此外，目前有 3 种商品化检测法，包括 FDA 批准的用于肠杆菌科和铜绿假单胞菌检测的 RAPIDEC-CARBA NP，仅供研究用的 Neo-Rapid Carb 筛查(Rosco-Diagnostica，Taastrup，丹麦)，以及仅供研究用的 Rapid Carb Blue (Rosco-Diagnostica)。商业化试剂采用冻干试剂，简化了试验方法。商品化检测方法的性能与手工 Carba NP 方法相当[217-218, 224]。

mCIM 最初于 2016 年由 CLSI 批准用于肠杆菌科，然后在 2017 年批准用于铜绿假单胞菌。mCIM 的原理是，当美罗培南纸片与产碳青霉烯酶菌在肉汤中共培养 4 h 后，碳青霉烯酶降解纸片上的碳青霉烯抗菌药物；而非 CP-CRO 的革兰阴性菌与美罗培南共培养 4 h 后，后者仍保持其抗菌活性。将美罗培南纸片从肉汤中取出，放置在 MHA 平板上，MHA 平板上预先接种碳青霉烯敏感指示菌株(大肠埃希菌 ATCC25922)，用来评估美罗培南纸片的活性。隔夜培养后，测量抑菌圈，来确定美罗培南是否已水解，直径 6～15 mm 表示待测菌产碳青霉烯酶；若直径≥19 mm，即美罗培南仍然有活性，表示不产碳青霉烯酶。该方法是 2015 年 Zwaluw 等发明的 CIM 方法的改良版[225]。虽然起初认为 CIM 方法对各种碳青霉烯酶的检测有很好的敏感性和特异性，但最近的数据表明，CIM 对 NDM 和 OXA-48 like 酶的检测有局限性[218]。尽管如此，该方法易操作和结果解释简单，试剂成本低(仅需要纸片和 MH 平板)，很容易在大多数实验室执行。为克服试验的缺点，CLSI 对 CIM 进行了修改，如接种 1 μl 肠杆菌科菌液，而不是 10 μl；用胰蛋白酶大豆肉汤替代水来孵育美罗培南纸片和菌液；将操作时间从 2 h 延长至 4 h；以及改变抑菌圈直径优化结果解释。CLSI 对 CIM 方法的改进提高了产 NDM 和 OXA-48 like 的检测性能，对肠杆菌科和铜绿假单胞菌中碳青霉烯酶检测的敏感性和特异性均高于 95%[217-218, 226]。mCIM 的主要缺点是需要隔夜培养，只能在 24 h 后才能得到结果。一些研究者缩短碳青霉烯敏感指示菌株培养时间至 6 h，以便更快地报告结果[225]。mCIM 对鲍曼不动杆菌分离株的敏感性为 71%～80%，特异性为 53%～70%[217, 221]，因此，CLSI 不建议检测鲍曼不动杆菌。

通过添加二价阳离子螯合剂和 MBL 抑制剂 EDTA，对 mCIM 进行了进一步的修饰，以鉴别 MBL 与丝氨酸碳青霉烯酶。eCIM(EDTA CIM)需要与 mCIM 并行执行，因为 eCIM 的解释需要对测试菌的 mCIM 进行评估。eCIM 对指示菌的抑菌圈与 mCIM 相比，差异＞5 mm 表明分离菌产生 MBL。如果≤4 mm 的差异，则分离菌产丝氨酸碳青霉烯酶，不被 EDTA 有效抑制。只有在

mCIM 阳性的情况下才能解释 eCIM。在 CLSI 调查的肠杆菌科菌株中，eCIM 区分 MBL 和丝氨酸碳青霉烯酶的敏感性＞95%，特异性＞92%(M100-S28[1]；CLSI，2017 年 6 月会议纪要)。值得注意的是，如果分离菌同时产丝氨酸碳青霉烯酶和 MBL，eCIM 不能区分不同的酶，可出现假阴性结果。这是大多数抑制剂检测方法的局限性。此外，一些 OXA 型酶也被 EDTA 抑制，因为高活性的酶二聚体形式的稳定需要二价阳离子。在 EDTA 存在下，OXA 型酶变成低活性单体形式，导致碳青霉烯酶活性降低和潜在的假阳性 MBL 结果[227-228]。引入新的 BL/BLI 组合，鉴别 MBL 与丝氨酸碳青霉烯酶有一定的临床意义，如头孢他啶-阿维巴坦、美罗培南-vaborbactam 和亚胺培南-relebactam，这些组合对丝氨酸碳青霉烯酶具有活性，但对 MBL 没有作用。因此，要检测产 MBL 时，如果没有特定试剂的 MIC 或纸片扩散法，不能使用上述这些新 BL/BLI 组合。然而，丝氨酸碳青霉烯酶的检测并不能保证这些抗菌药的活性，因为并非所有产丝氨酸碳青霉烯酶菌对这些药物敏感[198, 229-230]。

与 eCIM 类似，已开发出多种基于抑制剂的方法用于检测和鉴别碳青霉烯酶的 Ambler 类(表 75-2)。这些方法通过添加或不添加一种或多种已知的抑制剂，来检测碳青霉烯类抗菌药(主要是美罗培南)，以区分碳青霉烯酶类别。A 类酶被硼酸抑制，硼酸也抑制 AmpC 酶。因此，为了区分由 A 类碳青霉烯酶介导的碳青霉烯耐药与 AmpC(染色体或质粒介导)合并孔蛋白丢失(非 CP-CRE)的耐药性，可以添加一种特异性 AmpC 抑制剂氯唑西林。B 类酶被二价阳离子螯合剂如 EDTA、2-巯基丙酸和吡啶酸抑制。目前还没有 D 类碳青霉烯酶的抑制剂。因此，如果碳青霉烯类耐药性不被上述任何抑制剂所抑制(通过排除法)，它可能是 ESBL 合并膜孔蛋白缺失，或是 D 类 OXA-48 like 酶。高水平替莫西林耐药，即 MIC＞32 μg/ml 或 30 μg 的纸片抑菌圈直径＜11 mm，可以认为是产 OXA-48 like 酶表型[231]。然而，这个方法不特异，因为其他耐药机制也可以呈现这种表型。因此，EUCAST 建议联合使用替莫西林和基于抑制剂的方法来区分 OXA-48 like 酶(HLR)介导的碳青霉烯类耐药和 ESBL 并膜孔蛋白缺失(HLR 阴性)。EUCAST 支持基于抑制剂的方法，如上文所述，使用有抑制剂和无抑制剂的联合纸片扩散法，类似于 CLSI 的 ESBL 确认试验[231]。基于抑制剂的许多检测方法已经模式化，基本上，上述的每种碳青霉烯酶表型检测都已转化为一种抑制剂试验。这些特定的碳青霉烯酶检测方法一般都方便、易行，且有良好的效果，但是明显的缺点是为了检测不同类型的碳青霉烯酶需要进行多个试验，甚至需要通过如上所述的排除法来检测 OXA 类碳青霉烯酶[212]。

MALDI-TOF 质谱已成为临床微生物实验室快速鉴定细菌重要方法，有些研究基于水解原理用质谱方法检测 β 内酰胺酶的活性。这些研究将细菌培养上清液或培养皿中的细菌与碳青霉烯抗菌药共培养一定时间，并通过 MALDI-TOF 质谱分析上清液，质谱峰与碳青霉烯抗菌药的峰一致时，结果为阴性，为非 CP CRO；当出现碳青霉烯代谢物相对应的峰时，表明碳青霉烯抗菌药被水解，结果为阳性，为 CPO[232]。总的来说，该方法在一些研究中显示出良好的敏感性和特异性[232-234]。添加 NH_4HCO_3 或 $ZnSO_4$ 分别提高了对产 OXA-48 like 和 MBL 的检测性能[233-234]。此外，该方法已应用在血培养阳性样本的直接检测[235]。这种方法经济又快速，但需要改变 MALDI-TOF 质谱仪的设置。因为该系统细菌鉴定最优的 m/z 范围为 2000～20 000，而药物代谢物的检测的 m/z 范围较低为 160～600。此外，还出现了紫外光谱法和液相色谱-串联质谱法的水解研究[236-237]。有一种利用电化学电流的一种新的水解方法，BYG(Bogaerts Yunus Glypczynski)Carba 试验，检测电敏感聚合物(聚苯胺)涂层电极的电导率变化，该电极对碳青霉烯酶水解亚胺培南过程中的 pH 和氧化还原活性高度敏感[238]。1181 株 CRE 菌株进行多中心试验结果显示，该方法的敏感性为 96%，特异性为 99%，阳性预测值为 99%，阴性预测值为 98%[239]。BYG Carba 是一种快速、客观、灵敏、特异的检测 CP-CRE 的方法[238]。

利用质谱检测碳青霉烯酶的其他方法包括 MALDI-TOF-MS 峰鉴定方法，该方法使用标准的菌种鉴定方法检测与碳青霉烯酶质粒相关的蛋白标志物的特异峰。到目前为止，这种方法只用于含有 blaKPC 的 pKpQIL 质粒检测，该质粒导致 2011 年 NIH 临床中心产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌暴发流行[240-241]。该方法的主要优点是在鉴定

菌种的同时，通过识别标准色谱图上的特定峰来检测产碳青霉烯酶菌。此外，一种花费 90 min，肽标记的液相色谱-串联质谱法，似乎是一种很有前景的新方法，其原理是利用胰蛋白酶消化后的 KPC 蛋白片段检测临床分离株中产 KPC 菌[242]。

现在，已开发了快速、简便的碳青霉烯酶免疫层析法。这些试验使用胶体金纳米颗粒结合到用单克隆抗体致敏的硝化纤维素膜上，单独或以多种形式检测特定的碳青霉烯酶，包括 KPC、NDM 和 OXA-48 like 酶(如 K-SeT 试验、Coris BioConcept 或 NDM LFIA)[243]。多项研究显示，纯培养或血培养样本的检测敏感性和特异性为 100%，检测限为 10^6 CFU/ml[3, 243-248]。在编写本书时，这些方法都没得到 FDA 的批准，但它们似乎可以替代分子生物学方法检测特定碳青霉烯酶，这种方法不仅经济，可以很容易纳入临床工作流程，在 15 min 内出结果。

6. 检测碳青霉烯类耐药菌定植 多重耐药革兰阴性菌(如 ESBL 和 CRO)在胃肠道的定植是医院环境中传播这些重要病原体的重要病菌库[200]。因此，许多医院选择筛选高危患者的多重耐药革兰阴性菌的定植，如来自或住院在流行地区的患者；重症监护室、移植和肿瘤患者；或有重大暴露史的患者，以实施感染控制干预，减少传播。检测方法包括培养法和核酸扩增法。核酸扩增法将在第 79 章中详述。一种理想的检测多重耐药的培养法必须是快速、准确，并且能够检测到低水平的耐药性(即 MICs 轻度升高)和低丰度耐药菌，特别是在粪便标本中[149, 249]。培养法方便、易得、成本低，包括肉汤富集法、直接选择性培养和显色培养基。这些方法的主要缺陷是检测时间较长，有些方法需要 3～4 天，所以不适用于感染控制。此外，许多选择性培养基的特异性不佳，需要花费额外的时间和试剂来鉴定菌种和药物敏感性试验，来排除假阳性。这些方法通常不区分耐药机制，因为要么选用第三代头孢菌素，要么用碳青霉烯，因此，如果需要检测特定的耐药机制，如产 ESBL 或碳青霉烯酶，则需要进一步对分离菌株进行基因型或表型检测。

最早检测粪便样本中 CRO 的方法是 CDC 肉汤富集法(CDC broth-enrichment method)[250]。CDC 方法的缺点有 2 点①直肠拭子中肠球菌的过度生长导致许多假阳性；②CP-CRO 的检测时间长达 4 天。此外，研究表明，尽管肉汤富集法是为了提高检测 CRO 的敏感性，事实上，由于高丰度菌的竞争干扰，它可能会阻碍碳青霉烯类低耐药或低丰度 CRO 的检出，从而建议取消肉汤富集步骤[251]。该方法的敏感性为 40%～80%，特异性为 68%～80%[249, 251]。另一种使用标准实验室用品检测粪便样本中 CRO 的方法是直接 MacConkey 平板法[252-253]，无须肉汤富集。这种方法将粪便标本直接接种 MacConkey 平板，在 1 区和 2 区的交界处贴碳青霉烯抗菌药纸片，在 2 区和 3 区的交界处再贴一个纸片。过夜培养后，在预先确定的直径内(如厄他培南 27 mm)检测革兰阴性杆菌的生长，并进行药物敏感试验[253]。用厄他培南纸片的该方法检测 CRO 的敏感性为 95%，检测直肠拭子的敏感性为 91%[251]。美罗培南敏感的铜绿假单胞菌生长过度，会影响产碳青霉烯酶肠杆菌科的检测，因此建议在 1 区贴厄他培南纸片检测单厄他培南耐药的 CREs，而在 2 区贴美罗培南纸片，抑制对美罗培南敏感的非发酵菌，因为它们可能会抑制一些 CREs 的检出[251]。MacConkey 平板法 24 h 内可获得阴性结果。阳性结果需要补充鉴定和药物敏感试验以确认是否存在假阳性，有条件时，建议采用基因型或表型方法检测碳青霉烯酶，检测时间取决于采用的方法和工作流程，最长达 3 天。

使用碳青霉烯类抗生素进行选择的显色培养基的检测时间与 MacConkey 平板法相似，并且由于易操作而被广泛用于直肠标本 CRO 筛查。与 MacConkey 平板法相比，显色培养基的优势在于根据培养基中的显色剂推测菌种。各种商用培养基检测不同种类碳青霉烯酶，且具有不同的敏感性(42%～96%)和特异性(59%～88%)。很少有研究评估针对肛周/直肠拭子样本的检测性能，而且这些研究大多局限于检测产 KPC 菌，具有较好的敏感性(75%～97%)和特异性(82%～99%)[249]。有些显色培养基是专门检测 KPC 的，对其他碳青霉烯酶类，特别是 OXA-48 like 酶的敏感性较低。大多数显色培养基对 D 类 OXA 酶的检测效果不佳，chromID OXA-48 like 培养基的出现解决了 OXA-48 like 酶检测的难题。chromID-CARBA(法国 BioMérieux)和 chromID-OXA-48 like 的双板可以覆盖临床上可能出现的所有种类碳青霉烯酶。同样的，实验室可以自己

配制一种特殊培养基，即Supercarba琼脂，在添加锌的Drigalski乳糖琼脂中加入厄他培南和氯唑西林，这种培养基的保质期为7天[4]。一些研究表明，该方法的敏感性>95%，特异性为60%[4, 254]。另外，利用第三代头孢菌素进行选择的显色培养基（即前述的ESBL显色培养基），同样可以检测CRO。其主要缺点是特异性低，因为能检测广谱头孢菌素耐药的革兰阴性杆菌，以及会漏检不能有效水解广谱头孢菌素的产OXA酶菌。有关各种显色培养基的详细资料和性能评估，读者可以参考Viau的综述[249]。

7. 头孢唑啉预测尿中分离的大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌的口服头孢菌素 口服头孢菌素是无并发症状尿路感染的经验性治疗药物。表达染色体介导的、可诱导的AmpC型β内酰胺酶的肠杆菌科细菌（肠杆菌属、柠檬酸杆菌属和沙雷菌属）可以被β内酰胺类抗生素显著诱导，酶的表达量增加，导致对第一代头孢菌素耐药。然而，有些肠杆菌科，如大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和奇异变形杆菌，缺乏染色体编码的可诱导AmpC β内酰胺酶，对第一代头孢菌素仍有活性。由于缺乏一些口服头孢菌素类药物的CLSI解释标准，如临床常用药头孢氨苄，以及自动化药敏检测系统缺少代表性的口服头孢菌素类；因此，需要替代试验来预测那些不表达诱导性AmpC的肠杆菌科细菌对这些药物的敏感性。此前，FDA和CLSI根据早期研究数据推荐头孢噻吩作为替代药物[255-256]，但最近的研究表明，在预测某些口服头孢菌素时，头孢噻吩表现出分类一致率低且重要误差率高[257-258]。因此，CLSI重新评估后，发现头孢唑啉MIC≤16 μl/ml可以预测以下口服头孢菌素的敏感性，包括头孢克洛、头孢地尼、头孢泊肟酯、头孢丙烯、头孢呋辛酯、头孢氨苄、氯碳头孢，用于治疗因大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌引起的无并发症状尿路感染[259]，预测的准确度达97.1%～100%。基于CLSI Ad Hoc口服头孢菌素工作组的研究结果，当前CLSI指南删除了头孢噻吩，制定了尿分离菌株的头孢唑啉折点，作为预测特定口服头孢菌素结果的替代性抗菌药物。值得注意的是，有些头孢唑啉耐药的菌株可能对更有效的口服药物（头孢泊肟、头孢呋辛、头孢地尼）敏感，当临床考虑使用这些药物治疗时，可以单独检测它们的敏感性[1]。最近的一些研究证实了CLSI工作组的结果，头孢唑啉的确优于头孢噻吩[260-261]。然而，BooStver的研究发现头孢唑啉预测头孢泊肟敏感性时，分类一致率只有92%，但重要误差率和极重要误差率分别高达4.4%和63.6%；用头孢呋辛预测时，分类一致率是84%，重要误差率和极重要误差率分别是1.1%和18.2%；结果表明头孢呋辛优于头孢唑啉，但是这项研究仅测试了11株头孢泊肟耐药菌株[260]。EUCAST设置了尿分离菌株的头孢菌素折点，如头孢羟氨苄、头孢氨苄、头孢克肟、头孢泊肟、头孢布定、头孢呋辛[8]。

四、革兰阴性杆菌非β内酰胺耐药表型检测

（一）培氟沙星作为肠沙门菌氟喹诺酮敏感性的替代药物

氟喹诺酮类药物是治疗沙门菌病的重要药，尤其是伤寒。近年来，随着沙门菌对氟喹诺酮类耐药的出现，其耐药机制的检测方法不断地被改进。喹诺酮类耐药肠道沙门菌的最常见耐药机制是染色体上喹诺酮耐药区 *gyrA* 和 *parC* 的靶位点突变，少数情况下是 *gyrB* 和 *parE* 突变[262-263]。最先，萘啶酸，一种非氟化喹诺酮，作为替代剂来检测喹诺酮类耐药。随着质粒介导的喹诺酮类药物耐药机制的发现，包括靶位点保护机制（*qnr* 变种）、外排泵（*oqxAB*、*qepA*）和环丙沙星/诺氟沙星的乙酰化[*aac*(6′)*Ib-cr*][264-265]，萘啶酸就很少用了，因为质粒介导的喹诺酮类耐药致喹诺酮类MICs升高，但对萘啶酸不耐药。2014年前，虽然一些沙门菌菌株的MIC在敏感范围（0.125～1μg/ml），但具有低水平氟喹诺酮耐药，氟喹诺酮类药物治疗失败的可能性大，而且在氟喹诺酮类的压力下菌株容易发展成高水平耐药[262]。为了克服这一问题，并支持药代动力学/药效学研究[266-267]，CLSI在2014年修订了环丙沙星、左氧氟沙星和氧氟沙星MIC折点，以更好地反映野生型沙门菌的药物敏感性分布。EUCAST和FDA也修订并下调了肠道沙门菌和伤寒沙门菌的环丙沙星折点，CLSI和FDA（仅对伤寒沙门菌）建立了环丙沙星纸片扩散法折点。降低折点的缺点是，

大多数自动化药物敏感性测试系统不能覆盖这么低的稀释度。因此，临床实验室需要验证和应用其他 AST 方法，其中许多方法不具备检测 MIC 能力。最近的一项研究表明，Etest 是一种可行的选择[268]。因此，EUCAST 和 CLSI 评估了多种替代纸片扩散法，来鉴别沙门菌属的氟喹诺酮敏感和不敏感[263,269]。两项研究发现，与萘啶酸和环丙沙星相比，培氟沙星能很好的将敏感和不敏感菌株区分。因此，EUCAST 和 CLSI 分别在 2014 年和 2016 年批准实施培氟沙星替代试验。培氟沙星替代试验的一个重要不足是不能检测到 *aac*(6′)*Ib-cr* 的存在，因为它是环丙沙星和诺氟沙星的特有耐药机制[263]。此外，美国没有培氟沙星纸片，但在资源有限的环境下它可能是一个实用的替代剂。CLSI 鼓励在环丙沙星纸片扩散试验和培氟沙星替代试验的基础上对沙门菌中的氟喹诺酮类药物进行 MIC 检测。方法学上，应该认识到不同厂家培氟沙星药片的差异及菌落的潜在耐药性[263]。由于萘啶酸不能检测沙门菌质粒介导的喹诺酮类耐药机制，在 2017 年 CLSI 指南已经删除了萘啶酸替代试验。

(二)革兰阴性杆菌黏菌素耐药的筛选试验

多黏菌素、黏菌素(多黏菌素 E)和多黏菌素 B，是治疗 MDR 革兰阴性菌感染的最后防线。它们是大分子量多阳离子抗菌肽，与革兰阴性菌带负电的细胞膜结合，导致外膜破裂，细胞内物质外漏，最终导致细胞死亡[270]。虽然黏菌素和多黏菌素 B 结构相似，而且作用机制相同，但它们的临床制剂的药代动力学/药效学参数差异很大，需要分别为它们建立临床折点[271]。多黏菌素的临床应用一直存在问题，包括缺乏肠杆菌科细菌临床折点，无有效 AST 方法，以及缺乏有力的临床研究。

最近，CLSI 和 EUCAST 组成联合工作组来建立标准化折点和黏菌素药物敏感性试验(不包括多黏菌素 B)。2016 年，不动杆菌和铜绿假单胞菌的黏菌素临床折点是，≤2 μg/ml 为敏感，≥4 μg/ml 为耐药。由于缺乏临床数据，基于区别野生株和非野生株的 MIC 分布数据，2017 年建立了某些肠杆菌科细菌的流行病学临界值，≤2 μg/ml 为野生株，≥4 μg/ml 为非野生株。这些细菌包括产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌，和解鸟氨酸拉乌尔菌。流行病学临界值允许医疗专业人员鉴别菌株具有或不具有获得性或基因突变性黏菌素耐药机制。

革兰阴性杆菌对黏菌素的耐药机制是，染色体上合成脂质 A 的双组分调节系统的突变导致脂多糖负电荷减少[271]。脂多糖的这种变化导致带正电荷的抗菌肽结合减少，产生耐药性。2015 年，中国首次出现了质粒介导的黏菌素耐药，此后在每个大陆都有相关报道[272]。新的耐药基因命名为 *mcr1*，是质粒编码的磷酸乙醇胺转移酶，它在脂质 A 中添加了一个磷酸乙醇胺基团，降低了负电荷[272]。2016 年，疾病预防控制中心建议任何黏菌素 MIC 为≥2 μg/ml 的肠杆菌科菌株需要检测质粒介导的黏菌素耐药基因 *mcr1*、*mcr2* 或 *mcr3* (https://emergency.CDC.gov/han/han00390.asp; https://www.CDC.gov/drugresistance/tracking-mcr1.html)。最近，人们发现 MCR 酶的活性需要锌离子，因此，使用二价螯合剂如 EDTA 或吡啶酸(类似于 MBL 试验)的抑制试验有望出现[273]。

由于黏菌素的理化特点，其 AST 方法一直存在问题。分子量大的多阳离子肽难以通过琼脂扩散，琼脂扩散检测误差率高，因此不推荐琼脂扩散法，如纸片扩散法和梯度扩散法外，带正电的抗菌肽与带负电的聚苯乙烯微孔板相互作用，导致药物浓度较低时 MIC 结果变化明显。表面活性剂(聚山梨酯 80)的使用可能会导致人为降低 MIC 值。因此，EUCAST 和 CLSI 联合工作组推荐无表面活性剂的微量肉汤稀释法作为检测黏菌素的参考方法。美国 FDA 要求制造商提交 510 K 审批文件中只能使用 FDA 折点来解释结果。因为缺乏 FDA 折点，所以美国开发的商品化试剂仅适用研究用途。如果没有 FDA 折点，就没有 FDA 批准的方法检测黏菌素敏感性。因此，临床实验室应当使用验证的肉汤稀释法进行试验或将菌株送到参考实验室检测。

临床实验室很少用宏量肉汤稀释法，因此需要简化革兰阴性菌黏菌素耐药的筛选方法。一种方法是多黏菌素 NP，它是类似 CarbaNP 的快速比色法，在 3.75μg/ml/孔黏菌素条件下，pH 指示剂检测葡萄糖代谢，2 h 出结果。此方法检测葡萄糖代谢，所以仅限于检测肠杆菌科细菌。检测敏感性为 99.3%，特异性为 95.4%。该方法具有与 CarbaNP 类似的局限性，需要制备专门的试剂，以

及橙色到黄色变化的结果解释具有主观性。CLSI 工作组正在评估另外 2 种方法：①含有 4 μg/ml 黏菌素的筛选琼脂平板；②肉汤-纸片洗脱法。由于琼脂筛选法需要与商业公司合作并提交 FDA 批准，该方法在美国的可用性可能会延迟。此外，黏菌素筛查试验阳性结果（假定黏菌素耐药/非野生株）需要进一步确认结果。因此，工作组目前正在对肉汤-纸片洗脱法进行评估。肉汤-纸片洗脱法是起源于 1972 年的古老、简单的方法，曾用于厌氧菌敏感性试验[274]。每株菌需要 4 管 10 ml 的 CA-MHB 肉汤，在肉汤中添加分别加入 0、1、2 和 4 个黏菌素（10 μg）纸片，配制终浓度为 0（生长对照）、1、2 和 4 μg /（ml · 管），以测定 MIC 值。单中心研究初步数据显示，与宏量肉汤稀释法相比，肉汤-纸片洗脱法检测 69 株 CRE 含 6 株黏菌素耐药菌株的分类一致率为 98.6%；检测 28 株革兰阴性菌（包括肠杆菌科细菌和非发酵菌）的分类一致率为 100%（参见 P. Simner 未发表的数据）。

参考文献请扫二维码查阅

第 76 章 抗菌药物敏感性试验方法：苛养菌*

ROMNEY M. HUMPHRIES, JENNIFER DIEN BARD

（张红梅 译；胡付品、俞云松、杨青 审校）

大多数苛养菌在标准体外药敏试验系统中，因使用不含添加剂的培养基而生长不良。对标准的 CLSI 纸片扩散法和 MIC 法稍做改进，临床一些常见的苛养菌如流感嗜血杆菌、淋病奈瑟菌、脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌和其他链球菌属细菌即可获得可靠的药敏结果。改进措施包括使用补充营养物质的培养基，适当延长孵育时间和（或）提高孵育时 CO_2 浓度（表 76-1）。CLSI 和（或）欧洲药敏试验委员会（EUCAST）为这些细菌制订了特定的抑菌圈直径和 MIC 折点，以及推荐质控菌株的可接受范围[1]。CLSI 也发布了少见菌或苛养菌经认可的药敏试验指南，见表 76-1 至表 76-3，包括潜在生物恐怖病原菌药敏试验指南（表 76-2）[2]。CLSI M45-A3 指南中这些细菌的解释标准主要沿用 CLSI 标准[1]，同时参考了文献和编写指南作者的经验。这点不同于 CLSI 抗菌药物敏感试验解释标准的制定，其来源于大量的微生物、临床和药效学数据，因此将 M45-A3 归类为指南而不是标准。表 76-3 总结了这些细菌的检测条件。

表 76-1 CLSI 和 EUCAST 受试苛养菌纸片扩散法和 MIC 法试验条件及推荐的质控菌株

微生物	方法	培养基	孵育环境[a]	孵育时间（h）	推荐质控菌株(s)
肺炎链球菌[b] 和链球菌属	纸片扩散法（CLSI）	MHA+5% 绵羊血	5%～7% CO_2	20～24	肺炎链球菌 ATCC 49619
	纸片扩散法（EUCAST）	MH-F	5% CO_2	18±2	肺炎链球菌 ATCC 49619
	BMD（CLSI）	CAMHB-LHB	大气环境	20～24	肺炎链球菌 ATCC 49619
流感嗜血杆菌	纸片扩散法（CLSI）	HTM 琼脂	5%～7% CO_2	16～18	流感嗜血杆菌 ATCC 49247，流感嗜血杆菌 ATCC 49766[c]
	纸片扩散法（EUCAST）	MH-F	5% CO_2	18±2	流感嗜血杆菌 ATCC 49766；金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 为监测 β-内酰胺类酶抑制剂合剂
	BMD（CLSI）	HTM 肉汤	大气环境	20～24	流感嗜血杆菌 ATCC 49247，流感嗜血杆菌 ATCC 49766[d]
淋病奈瑟菌	纸片扩散法（CLSI）	GC 琼脂+补充成分	5%～7% CO_2	20～24	淋病奈瑟菌 ATCC 49226
	琼脂稀释法（CLSI）	GC 琼脂+补充成分	5%～7% CO_2	20～24	淋病奈瑟菌 ATCC 49226
脑膜炎奈瑟菌	纸片扩散法（CLSI）	MHA+5% 绵羊血	5%～7% CO_2	20～24	肺炎链球菌 ATCC 49619
	BMD（CLSI）	CAMHB-LHB	5%～7% CO_2	20～24	肺炎链球菌 ATCC 49619
	琼脂稀释法（CLSI）	MHA +5% 绵羊血	5%～7% CO_2	20～24	肺炎链球菌 ATCC 49619

注：[a] 孵育温度，35℃；[b] 对肺炎链球菌，EUCAST 推荐接种物为绵羊血平板上的菌配成 0.5 麦氏单位或巧克力琼脂上的菌配成 1 麦氏单位，CLSI 推荐隔夜绵羊血琼脂平板上菌配成 0.5 麦氏单位；[c] 此外，流感嗜血杆菌 ATCC 10211 可用来评估 HTM 琼脂支持细菌生长的能力；[d] 流感嗜血杆菌 ATCC 49766 用于受试头孢菌素（如头孢克洛、头孢孟多和头孢呋辛）的质量控制

* 本章包含 Romney M. Humphries 和 Janet A. Hindler 在本手册第 11 版第 74 章中呈现的部分内容

表 76-2　潜在生物恐怖病原菌 BMD MIC 试验条件、推荐质控菌株和推荐测试药物

微生物	培养基	接种物来源[a]	孵育环境[b]	孵育时间(h)	推荐质控菌株	推荐测试药物
炭疽芽胞杆菌	CAMHB	16～18 h 生长物（羊血琼脂平板）	大气环境	16～20	大肠埃希菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213	环丙沙星、多西环素、左氧氟沙星、青霉素
布鲁菌	布氏肉汤，pH 调至 7.1 ± 0.1	48 h 生长物（羊血琼脂平板）	大气环境[c]	48	大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎链球菌 ATCC49619	多西环素、庆大霉素、四环素、甲氧苄啶-磺胺异噁唑、链霉素[d]
鼻疽伯克霍尔德菌、类鼻疽伯克霍尔德菌	CAMHB	16～18 h 生长物（羊血琼脂平板）	大气环境	16～20	大肠埃希 ATCC25922、大肠埃希菌 ATCC 35218[e]、铜绿假单胞菌 ATCC27853	阿莫西林/克拉维酸和甲氧苄啶-磺胺异噁唑（仅对类鼻疽伯克霍尔德菌）、头孢他啶、多西环素、亚胺培南、四环素
土拉热弗朗西斯菌	CAMHB 加 2% 特定营养物，pH 调至 7.1 ± 0.1	24 h 生长物（巧克力琼脂平板）	大气环境	48	大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC29213、铜绿假单胞菌 ATCC27853	氯霉素、环丙沙星、多西环素、庆大霉素、左氧氟沙星、链霉素、四环素
鼠疫耶尔森菌	CAMHB	24 h 生长物（羊血琼脂平板）	大气环境	24[f]	大肠埃希菌 ATCC25922	氯霉素、环丙沙星、多西环素、庆大霉素、左氧氟沙星、链霉素、四环素、甲氧苄啶-磺胺异噁唑

注：[a] CAMHB 中菌悬液标准浊度为 0.5 麦氏标准；微生物最终浓度为 5×10^5 CFU/ml；[b] 孵育温度：35 ℃；[c] 一些分离株需在 5% CO_2 环境中生长；[d] 5% CO_2 与大气环境条件下生长的药敏试验折点不同；[e] 大肠埃希菌 ATCC 35 218 为测试 β-内酰胺类酶抑制剂合剂的质控菌株；[f] 如果在培养基上生长不良，继续孵育 24 h

对其他苛养菌如鲍特菌属（*Bordetella* spp.）和军团菌属（*Legionella* spp.），没有专门的推荐。部分原因是：①这些细菌引起的感染通常对选择的药物有反应；②很少从患者中获得这些细菌；③分离株很难生长或需要特殊的培养基。

除了常规的 MIC 测试方法（如琼脂稀释法或肉汤稀释法），梯度扩散法已用于多种苛养菌的检测。梯度扩散法允许放置测试条于特殊的培养基和不同的孵育条件，该法的局限性包括价格昂贵和缺少经美国 FDA 批准的可用于许多不常见苛养菌的测试条。在美国，药物梯度试条用于临床试验之前，必须获得 FDA 对特定微生物-抗菌药物组合的批准。如果尚未获得 FDA 批准，实验室应进行验证研究，符合临床实验室改进法案的要求后，才能用于批准范围之外的细菌，对患者报告结果才是合格的。但是，对于不包含在 CLSI M100（第 27 版）、M45-A3 或 EUCAST 临床折点表中的细菌，情况就变得复杂，因为缺乏明确的药敏试验方法来比较结果。遇到这种情况，实验室可以考虑与著名的实验室交换菌株作为验证研究的一种手段。

本章总结了 CLSI 和 EUCAST 对链球菌属（包括肺炎链球菌）、流感嗜血杆菌、淋病奈瑟菌和脑膜炎奈瑟菌推荐的标准药敏试验方法。CLSIM45-A3 指南和 EUCAST 临床折点表中对少见菌和苛养菌药敏试验的方法、判定标准、结果报告及 CLSI 和 EUCAST 指南的不同处均一一列出。

过去，对呼吸道病原体包括流感嗜血杆菌、肺炎链球菌和卡他莫拉菌的区域性和全球性耐药监测研究都定期进行。然而，现在研究数量有所下降，较难获得这些细菌全球耐药率准确的变化情况。同样对大多数少见菌和苛养菌耐药监测研究也较少，耐药率的报道主要见于单中心研究和病例系列报道。尽管如此，目前已发表的文献中这些微生物的耐药率变化也为本章提供了大量数据。

表 76-3 少见苛养菌纸片扩散法和 MIC 法试验条件、推荐质控菌株及首选测试药物

微生物	方法	培养基	接种物来源[a]	孵育环境[b]	孵育时间(h)	推荐质控菌株	首选测试药物[c]
乏养菌属 颗粒链菌属	BMD (CLSI)	CAMHB-LHB 加 0.001% 盐酸吡哆醛	20～24 h 生长物(含半胱氨酸 CHOC)	大气环境	20～24	肺炎链球菌 ATCC49619	头孢噻肟或头孢曲松、青霉素 万古霉素
气球菌属	BMD (CLSI)	CAMHB-LHB	16～18 h 生长物(SBA)	5% CO_2	20～24	肺炎链球菌 ATCC49619	青霉素、头孢曲松、万古霉素
	纸片扩散法(EUCAST)	MH-F	非选择性培养基过夜生长物	5% CO_2	16～20 或 40～44 如果生长不充分	肺炎链球菌 ATCC49619	无推荐
气单胞菌属	BMD (CLSI)	CAMHB	16～18 h 生长物(SBA)	大气环境	16～20	大肠埃希菌 ATCC 25922,大肠埃希菌 ATCC 35218[d]	三代或四代头孢菌素、氟喹诺酮类、甲氧苄啶-磺胺异噁唑
	纸片扩散法(CLSI)	MHA	16～18 h 生长物(SBA)	大气环境	16～18	大肠埃希菌 ATCC 25922,大肠埃希菌 ATCC 35218	三代或四代头孢菌素、氟喹诺酮类、甲氧苄啶-磺胺异噁唑
芽胞杆菌属及相关属	BMD (CLSI)	CAMHB	16～18 h 生长物(SBA)	大气环境	16～20	金黄色葡萄球菌 ATCC29213	克林霉素、氟喹诺酮类、万古霉素
空肠/结肠弯曲菌	BMD (CLSI)	CAMHB-LHB	24～48h 生长物(SBA)	10% CO_2, 5% O_2, 85% N_2 微需氧	36℃48 或 42℃24	空肠弯曲菌 ATCC 33560	环丙沙星、红霉素、四环素
	纸片扩散法(CLSI)	MHA+5%绵羊血	24～48h 生长物(SBA)	10% CO_2, 5% O_2, 85% N_2 微需氧	42℃24	金黄色葡萄球菌 ATCC 25923	环丙沙星、红霉素、四环素
	纸片扩散法(EUCAST)	MH-F	非选择性培养基过夜生长物	微需氧环境 41±1℃	24	空肠弯曲菌 ATCC 33560	无推荐
棒杆菌属	BMD (CLSI)	CAMHB-LHB	24～48h 生长物(SBA 或 CHOC)	大气环境	24～48	肺炎链球菌 ATCC49619 庆大霉素用大肠埃希菌 ATCC 25922	红霉素、庆大霉素、青霉素、万古霉素
	纸片扩散法(EUCAST)	MH-F	非选择性培养基过夜生长物	5% CO_2	16～20 或 40～44 如果生长不良	肺炎链球菌 ATCC49619	无推荐
猪红斑丹毒丝菌	BMD (CLSI)	CAMHB-LHB	18～24 h 生长物(SBA)	大气环境	20～24	肺炎链球菌 ATCC49619	青霉素或氨苄西林

（续　表）

微生物	方法	培养基	接种物来源[a]	孵育环境[b]	孵育时间(h)	推荐质控菌株	首选测试药物[c]
李生球菌属	BMD (CLSI)	CAMHB-LHB	18～24 h 生长物(SBA)	5% CO_2	24～48	肺炎链球菌 ATCC49619	头孢噻肟或头孢曲松、青霉素、万古霉素
HACEK 群	BMD (CLSI)	CAMHB-LHB 或 HTM 或添加维生素 K(1μg/ml)、血红素（5μg/ml）、5%LHB 的布鲁菌肉汤	24～48h 生长物(CHOC)	5% CO_2	24～48	肺炎链球菌 ATCC49619，大肠埃希菌 ATCC 35218(β-内酰胺类酶抑制剂合剂)	氨苄西林、阿莫西林-克拉维酸、头孢曲松或头孢噻肟、环丙沙星或左氧氟沙星、亚胺培南、甲氧苄啶-磺胺异噁唑
幽门螺杆菌	琼脂稀释法(CLSI)	MHA+5% 陈旧(≥2 周)绵羊血	72 h 生长物(SBA)[c]	微需氧环境（由弯曲杆菌气体发生系统提供）	72	幽门螺杆菌 ATCC 43504	克拉霉素
金氏金氏菌	纸片扩散法(EUCAST)	MH-F	非选择性培养基过夜生长物	5% CO_2	16～20 或 40～44 如果生长不良	流感嗜血杆菌 ATCC49766	
乳杆菌属	BMD (CLSI)	CAMHB-LHB	18～24 h 生长物(SBA)	5% CO_2	24～48	肺炎链球菌 ATCC49619、大肠埃希菌 ATCC25922(庆大霉素)	青霉素或氨苄西林
乳球菌属	BMD (CLSI)	CAMHB-LHB	18～24 h 生长物(SBA)	大气环境	20～24	肺炎链球菌 ATCC49619	头孢曲松、克林霉素、红霉素、青霉素或氨苄西林、万古霉素
明串珠菌属	BMD (CLSI)	CAMHB-LHB	18～24 h 生长物(SBA)	大气环境	20～24	肺炎链球菌 ATCC49619、大肠埃希菌 ATCC25922(庆大霉素)	青霉素或氨苄西林
单核细胞增生李斯特菌	BMD (CLSI)	CAMHB-LHB	18～24 h 生长物(SBA)	大气环境	20～24	肺炎链球菌 ATCC49619	青霉素或氨苄西林、甲氧苄啶-磺胺异噁唑
	纸片扩散法(EUCAST)	MH-F	非选择性培养基过夜生长物	5% CO_2	16～20	肺炎链球菌 ATCC49619	
微球菌属	BMD (CLSI)	CAMHB	18～24 h 生长物(SBA)	大气环境	20～24	金黄色葡萄球菌 ATCC29213	青霉素、万古霉素
卡他莫拉菌	BMD (CLSI)	CAMHB	18～24 h 生长物(SBA)	大气环境	20～24	金黄色葡萄球菌 ATCC29213、大肠埃希菌 ATCC 35218(β-内酰胺类酶抑制剂合剂)	头孢克洛或头孢呋辛、甲氧苄啶-磺胺异噁唑
	纸片扩散法(CLSI)	MHA	18～24 h 生长物(SBA)	大气环境	20～24	金黄色葡萄球菌 ATCC25923 大肠埃希菌 ATCC 35218(β-内酰胺类酶抑制剂合剂)	阿莫西林-克拉维酸、甲氧苄啶-磺胺异噁唑

（续 表）

微生物	方法	培养基	接种物来源[a]	孵育环境[b]	孵育时间(h)	推荐质控菌株	首选测试药物[c]
	纸片扩散法（EUCAST）	MH-F	非选择性培养基过夜生长物	5% CO_2	16～20	流感嗜血杆菌 ATCC49766、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213(β-内酰胺类酶抑制剂合剂）	无推荐
巴斯德菌属	BMD (CLSI)	CAMHB-LHB	18～24 h 生长物(SBA)	大气环境	18～24	肺炎链球菌 ATCC49619 大肠埃希菌 ATCC35218(β-内酰胺类酶抑制剂合剂）	β-内酰胺类酶抑制剂合剂、头孢菌素类、氟喹诺酮类、大环内酯类、青霉素类、四环素类、甲氧苄啶-磺胺异噁唑
	纸片扩散法（CLSI）	MHA+5%绵羊血	18～24 h 生长物(SBA)	大气环境	16～18	肺炎链球菌 ATCC49619、大肠埃希菌 ATCC35218，金黄色葡萄球菌 ATCC25923（阿莫西林-克拉维酸）	β-内酰胺类酶抑制剂合剂、头孢菌素类、氟喹诺酮类、大环内酯类、青霉素类、四环素类、甲氧苄啶-磺胺异噁唑
	纸片扩散法（EUCAST）	MH-F	非选择性培养基过夜生长物	5% CO_2	16～20	流感嗜血杆菌 ATCC49766、金黄色葡萄球菌 ATCC29213(β-内酰胺类酶抑制剂合剂）	无推荐
片球菌属	BMD (CLSI)	CAMHB-LHB	18～24 h 生长物(SBA)	大气环境	20～24	肺炎链球菌 ATCC49619	青霉素或氨苄西林
黏滑罗氏菌	BMD (CLSI)	CAMHB-LHB	18～24 h 生长物(SBA)	大气环境	20～24	肺炎链球菌 ATCC49619	青霉素、万古霉素
弧菌属[d]	BMD (CLSI)	CAMHB	16～218h 生长物(SBA)	大气环境	16～20	大肠埃希菌 ATCC 25922，铜绿假单胞菌 ATCC27853(碳青霉烯类）、大肠埃希菌 ATCC35218(β-内酰胺类酶抑制剂合剂）	弧菌属(非霍乱弧菌)：头孢噻肟、头孢他啶、四环素或多西环素、氟喹诺酮类 霍乱弧菌：氨苄西林、阿奇霉素、氯霉素、多西环素、磺胺类、四环素、甲氧苄啶-磺胺异噁唑
	纸片扩散法（CLSI）	MHA	16～18 h 生长物(SBA)	大气环境	16～18	大肠埃希菌 ATCC 25922，铜绿假单胞菌 ATCC27853(碳青霉烯类）、大肠埃希菌 ATCC35218(β-内酰胺类酶抑制剂合剂）	弧菌属(非霍乱弧菌)：头孢噻肟、头孢他啶、四环素或多西环素、氟喹诺酮类 霍乱弧菌：氨苄西林、阿奇霉素、氯霉素、多西环素、磺胺类、四环素、甲氧苄啶-磺胺异噁唑

注：[a] 菌悬液用 MHB 或生理盐水配成 0.5 麦氏标准；肉汤稀释法最终接种菌量为 5×10^5 CFU/ml；CHOC. 巧克力琼脂；SBA. 绵羊血琼脂；[b] 孵育温度，35 ℃(除了空肠弯曲菌和结肠弯曲菌)；[c] 无推荐；[d] 对嗜盐弧菌，在 0.85% 的氯化钠溶液准备接种物；[e] 菌悬液用生理盐水配成 2.0 麦氏标准

一、肺炎链球菌

(一)耐药性

肺炎链球菌对青霉素耐药是因为青霉素结合蛋白(PBPs)发生改变，尤其是 PBPs 1a 和 2b 及 2x，导致其和青霉素类及其他 β-内酰胺类亲和力降低[3]。PBPs 改变是相关链球菌同源基因重组的结果。自 1967 年首次报道后，耐青霉素肺炎链球菌的检出率在全球范围逐步升高。在美国和其他将 PCV-7 用作常规免疫接种一部分的国家中，由于蛋白-多聚糖结合 7 价肺炎链球菌疫苗(PCV-7)的引入曾经有几年中断了这种增长趋势[4]。PCV-7 应用几年后，出现了耐青霉素和多重耐药菌及非疫苗血清型(如 6C、15A、19A 和 23A)[5]，肺炎链球菌对青霉素耐药形势又回到了前-PCV-7 时代[5-6]。这段时间里，美国儿童侵袭性肺炎链球菌感染性疾病的发生率一直趋于平稳。2010 年，包含最常见青霉素耐药肺炎链球菌血清型 19A 的 13 价肺炎链球菌结合疫苗(PCV-13)投入市场[5,7]。该疫苗使用 3 年后，发现在所有年龄段，由 PCV-13 所含血清型引起的抗菌药物不敏感侵袭性肺炎链球菌疾病显著减少[4]。

CLSI 青霉素对肺炎链球菌的折点有 3 种：脑膜炎、非脑膜炎和口服青霉素 G[1,8]。肺炎链球菌脑膜炎折点≤0.06 μg/ml 敏感，≥0.12 μg/ml 耐药，无中介分类。非脑膜炎折点≤2 μg/ml 敏感，4 μg/ml 中介，≥8 μg/ml 耐药。口服青霉素折点≤0.06 μg/ml 敏感，0.12～1.00 μg/ml 中介，≥2 μg/ml 耐药[1]。而 EUCAST 对肺炎链球菌建立了两种折点。EUCAST 脑膜炎折点和 CLSI 一致，但对脑膜炎以外的感染，EUCAST 定义为≤0.06 μg/ml 敏感，0.12～2.00 μg/ml 中介，>2 μg/ml 耐药。EUCAST 还进一步提供了基于剂量的肺炎链球菌性肺炎青霉素 MIC 解释规则：如果每 6 小时使用 1.2 g 青霉素，则青霉素 MIC≤0.5 μg/ml 为敏感；如果每 6 小时使用 2.4g 或每 4 小时 1.2 g，则 MIC≤1 μg/ml 为敏感；如果每 4 小时使用剂量 2.4g，则 MIC≤2 μg/ml 为敏感[9]。

由于青霉素对肺炎链球菌有多种折点，因此敏感性监测数据的解释比较复杂。美国疾病预防控制中心(CDC)[10]每年会报告引起侵袭性疾病的肺炎链球菌的药物敏感性情况。据报道，2014 年测试的 2485 株分离株中，使用 CLSI 非脑膜炎折点判断 94.8%对青霉素敏感。全球抗菌药物耐药性评估(Assessing Worldwide Antimicrobial Resistance Evaluate，AWARE)监测计划报告了 2014 年从美国医院中获得的 2614 株肺炎链球菌对青霉素的敏感性[11]。按照 CLSI 脑膜炎折点判断，青霉素敏感率为 60.4%，按照非脑膜炎折点判断则为 93.7%。青霉素耐药性因地理位置而异。例如，一项覆盖 2011 至 2014 年分离株的研究表明，使用 CLSI 非脑膜炎折点，对青霉素不敏感(中介或耐药)的菌株亚太地区 21%、欧洲 10%、南美洲 12%、北美洲 10%[12]。而在刚果民主共和国，青霉素非敏感株的比例超过 30%[13]。

对青霉素敏感的肺炎链球菌通常对其他 β-内酰胺类亦敏感，但当青霉素 MIC 升高时，其他 β-内酰胺类药物的 MICs 也同样会升高[14]。与青霉素一样，肺炎链球菌对这些 β-内酰胺类的折点 CLSI 和 EUCAST 也存在差异。CLSI 已建立了对头孢吡肟、头孢噻肟和头孢曲松的脑膜炎折点，而 EUCAST 仅发布了对青霉素的脑膜炎折点。CLSI 和 EUCAST 头孢洛林折点相差一个稀释度，CLSI 定义敏感为≤0.5 μg/ml(未建立中介或耐药分类)，EUCAST 定义敏感为≤0.25μg/ml，耐药为>0.25μg/ml。和青霉素一样，目前对广谱头孢菌素的耐药性因地理位置而异[12]。美国 2014 年 AWARE 项目报告按照 CLSI 非脑膜炎折点(MIC≤1 μg/ml)，头孢曲松敏感性为 94.7%，而按照 CLSI 脑膜炎折点(MIC≤0.5 μg/ml)敏感率为 82.6%。在这项研究中，美洛培南敏感性为 82.2%[11]。最近的数据表明，头孢洛林是 β-内酰胺类中对肺炎链球菌活性最强的药物，耐药非常罕见[11]。最近报道的一株头孢洛林非敏感株血清型 35B，具有 PBP2x 多个突变和 *murM* 改变[11]。

除糖肽类药物外，目前所有可用于治疗肺炎链球菌感染的其他抗菌药物均可出现耐药。这些抗菌药物大部分都存在 CLSI 和 EUCAST 折点的差异。后 PCV-7 时代，在美国对大环内酯类和克林霉素的耐药率呈上升趋势，显然与大环内酯类使用有关[15]。CDC 报道 PCV-7 使用前 79.5% 的分离株对大环内酯类敏感(MIC≤0.25 μg/ml)，随后其敏感率降至 2009 年的 74.9%和 2015 年的 69.6%。一些国家如中国，大环内酯类耐药性传播广泛，近期报道对红霉素耐药率>90%[16]。携

带大环内酯-林可酰胺-链阳霉素 B(MLS)型耐药基因(由 *ermB* 基因编码)的肺炎链球菌对红霉素的 MIC 通常≥64 μg/ml，对克林霉素 MIC≥8 μg/ml。而 M 表型(由 *mef A* 基因编码)菌株对红霉素 MICs 1～32 μg/ml，对克林霉素 MICs≤0.25 μg/ml。人们一度对 M 表型低水平红霉素耐药菌株的临床意义有过争议，但已有这种菌株治疗失败的报道[17]。红霉素耐药克林霉素敏感也可能提示存在一种可诱导的 *ermB* 基因[18]。对于这类菌株，延长克林霉素治疗时间理论上存在着从诱导型耐药演变为结构性耐药的风险，尽管这在肺炎链球菌中尚未被具体证实。肺炎链球菌对红霉素的药敏结果可预测阿奇霉素、克拉霉素、地红霉素的敏感性和耐药性[1]。泰利霉素为酮内酯类药物，其对肺炎链球菌的抗菌活性被认为优于大环内酯类，美国一研究表明 2014 年不到 1%的分离株对其耐药，而 62.2%的分离株对阿奇霉素敏感[19]。

2015 年 CDC 报告甲氧苄啶-磺胺异噁唑(TMP-SMX)的敏感性为 81.3%[10]。氟喹诺酮类耐药率一直保持在<0.5%的低水平[10]，而耐药菌株更常见于老年患者分离株[20-21]。

(二)参考试验方法

CLSI 和 EUCAST 均提供了肺炎链球菌肉汤微量稀释法(BMD)和纸片扩散法药敏试验。这些方法的详细信息见表 76-1，两者的区别在于试验所用培养基不同；CLSI 推荐阳离子调节 Mueller-Hinton 肉汤(CAMHB)补充 2.5%～5%裂解马血(CAMHB-LHB)用于 MIC 试验，纸片扩散法使用含 5%绵羊血的 Mueller Hinton 琼脂(BMHA)。而 EUCAST 推荐使用 Mueller-Hinton 苛养(MH-F)培养基，Mueller-Hinton 琼脂或肉汤补充 5%脱纤维蛋白马血和 20 mg/L β-NAD。

BMD 可用于 CLSI 或 EUCAST 推荐的肺炎链球菌所有抗菌药物的测试。除苯唑西林纸片扩散法测试青霉素敏感性外，纸片扩散法检测 β-内酰胺类包括头孢菌素的结果不可靠。CLSI 和 EUCAST 提供的指南中苯唑西林纸片替代试验的解释有所不同。CLSI 推荐使用 1 μg 苯唑西林纸片，抑菌圈直径≥20 mm 预测青霉素敏感，无论是采用更保守的脑膜炎折点抑或口服青霉素折点[1]。抑菌圈直径≤19 mm 的菌株不能轻易判为耐药，至少应测定青霉素和超广谱头孢菌素或美罗培南的 MICs。CLSI 规定苯唑西林筛选试验仅用于非危及生命的感染患者的分离株。EUCAST 指南指出，使用肺炎链球菌折点，抑菌圈直径≥20 mm 的分离株对所有 β-内酰胺类药物敏感，除外头孢克洛因已有中介报道。如苯唑西林抑菌圈直径≤19 mm，EUCAST 提供了一套比较复杂的规则：如果对脑膜炎患者使用苄青霉素，或者对适应证患者使用苯氧甲基青霉素，则苯唑西林抑菌圈直径≤19 mm 的菌株应报告耐药；如果将苄青霉素用于非脑膜炎感染，则苯唑西林抑菌圈直径≤19 mm 的菌株需测定 MIC；如对非脑膜炎感染，使用氨苄西林、阿莫西林或哌拉西林(含或不含 β-内酰胺酶抑制剂)，或者使用头孢吡肟、头孢噻肟、头孢洛林、头孢吡普或头孢曲松，苯唑西林抑菌圈直径≥8 mm，则应报告敏感；如果苯唑西林抑菌圈直径<8 mm，则须测定这些抗菌药物的 MIC。氨苄西林的 MIC 值可推测氨苄西林、阿莫西林和哌拉西林(含或不含 β-内酰胺酶抑制剂)的 MIC 值。

如果测试克林霉素，CLSI 和 EUCAST 均规定要筛选诱导性克林霉素耐药。可通过 D 试验完成，将含 15 μg 红霉素的纸片和含 2 μg 克林霉素的纸片相距 12 mm 贴于 BMHA 平板上，邻近红霉素纸片侧克林霉素抑菌环出现截平现象提示存在可诱导的克林霉素耐药。CLSI 还提供了 BMD 微量稀释法，微孔中含 1 μg/ml 红霉素和 0.5 μg/ml 克林霉素[1]，细菌生长提示存在可诱导的克林霉素耐药。

四环素，尤其是多西环素常常用作为门诊和青霉素过敏患者社区获得性肺炎治疗的替代性药物。2013 年 CLSI 将肺炎链球菌对四环素的敏感折点由≤2 μg/ml 修订为≤1 μg/ml，同时引入多西环素折点[1]，这和 EUCAST 的折点一致。CLSI 认为米诺环素的敏感性可由四环素试验结果推测而来[1]，而 EUCAST 定义肺炎链球菌对米诺环素的敏感折点为≤0.5 μg/ml。

(三)商品化试验方法

有多种方法可测定各种抗菌药物对肺炎链球菌的 MICs。Etest 法(法国生物梅里埃)已被广泛使用[22-23]，大多数相关药物的结果准确性>90%[22-23]。青霉素 Etest 法极小误差相对高一些，MICs 值稍低于参考肉汤微量稀释法[22]。由于

Etest 法建议在 CO_2 环境下孵育，大环内酯类和酮内酯类抗菌药物的 MIC 值往往比在大气环境下孵育的参考肉汤稀释法结果高 1～2 个稀释倍数。其原因是在 CO_2 环境下孵育，pH 降低导致这些药物抗菌活性降低。

其他商品化的经 FDA 批准的可测试肺炎链球菌的特定药敏板或仪器系统包括 Microscan（贝克曼库尔特，West Sacramento，CA）、凤凰（BD 诊断系统，Sparks，MD）、Sensititre（赛默飞，Cleveland，OH）和 VITEK 2（生物梅里埃，Inc.，Durham，NC）。Microscan、MICroSTREP、Sensititre、VITEK 2 和凤凰系统都已经过评估，证明其 MIC 和 CLSI 参考肉汤微量稀释法结果具可比性[23-25]。

(四)试验和结果报告策略

CLSI 建议，从脑脊液分离的肺炎链球菌应采用可靠的 MIC 法常规测试其对青霉素和头孢噻肟、头孢曲松或美罗培南的敏感性[1]。对于脑脊液分离株，与青霉素一样，仅按脑膜炎折点报告头孢噻肟和头孢曲松的结果；其他部位的分离株，应同时以按脑膜炎折点和非脑膜炎折点报告上述药敏结果[1]。此外，对于脑脊液分离株，MIC 法和纸片扩散法均可用于万古霉素的测定。对非脑脊液分离株，CLSI 推荐除青霉素外，还应测试并报告红霉素和甲氧苄啶-磺胺异噁唑的敏感性[1]。非脑脊液分离株，可以采用 MIC 法测定青霉素、头孢噻肟或头孢曲松和（或）美罗培南，MIC 法或纸片扩散法测定万古霉素、一种氟喹诺酮类和四环素或多西环素。对红霉素耐药、克林霉素敏感或中介的分离株，报告克林霉素敏感之前，应进行诱导克林霉素耐药试验[1]。

二、肺炎链球菌外的其他链球菌

(一)耐药性

由于草绿色链球菌和 β-溶血链球菌对 β-内酰胺类的敏感性有显著差异，这些细菌对氨苄西林、青霉素、头孢噻肟、头孢曲松和头孢吡肟的折点是独立的[1]。β-溶血链球菌包括携带 A（化脓链球菌）、C 或 G 抗原的形成大菌落的化脓性链球菌及携带 B 抗原的链球菌（无乳链球菌）。草绿色链球菌包括变异群（*mutans group*）、唾液群（*salivarius group*）、牛群（*bovis group*）、咽峡炎群（*anginosus group*）和缓症群（*mitis group*）。咽峡炎群包括携带 A、C、F、G 抗原的形成小菌落的 β-溶血链球菌。

CLSI 仅建立了 β-溶血链球菌对青霉素（≤0.12 μg/ml）、氨苄西林（≤0.25 μg/ml）、头孢烯类（≤0.5 μg/ml）和碳青霉烯类敏感的折点[1]。而 EUCAST β-内酰胺类仅设立了青霉素的折点（敏感≤0.25 μg/ml）[9]。CLSI 和 EUCAST 推荐其他 β-内酰胺类的敏感性可从青霉素的敏感性推导。尽管 β-溶血链球菌对青霉素高度敏感，但已有报告无乳链球菌[26-29]和 C 群链球菌[30]青霉素 MIC 0.25～1.00 μg/ml 不等。无乳链球菌青霉素 MIC 升高源于 PBP_{2x} 基因的一个点突变。青霉素敏感株通过等位基因互换导入突变的 PBP_{2x} 导致青霉素 MIC 升高[27]。这些 β-溶血链球菌青霉素 MIC 值升高的临床意义还未明确。相对于青霉素敏感株，青霉素敏感性降低菌株更易出现对氟喹诺酮类的不敏感和大环内酯类的耐药性[31]。近期法国一项已进行了八年的研究中报道了已出现对高水平氨基糖苷类药物耐药的无乳链球菌[32]。

β-溶血链球菌 *erm* 基因介导的 MLS 型大环内酯类耐药既可为诱导型也可为结构型。CLSI 定义红霉素和克林霉素≤0.25 μg/ml 为敏感，≥1.0 μg/ml 为耐药。EUCAST 红霉素敏感和耐药的折点分别为≤0.25 μg/ml 和>0.5 μg/ml，克林霉素的折点为≤0.5 μg/ml 和>0.5 μg/ml[1,9]。2014 年美国 874 株 β-溶血链球菌中红霉素和克林霉素耐药率分别为 37.6% 和 21.6%[33]。美国 155 株化脓链球菌中，对红霉素和克林霉素耐药率分别为 13.5%和 3.9%。而 153 株无乳链球菌对红霉素和克林霉素耐药率分别为 54%和 33%[34]。而同期加拿大和欧洲的无乳链球菌分离株对红霉素和克林霉素的耐药率明显低于美国[35]。2013 年曾报道两株万古霉素耐药的无乳链球菌携带 *VanG* 基因[36]。

β-溶血性链球菌对四环素类的耐药率不一，对氟喹诺酮类的耐药率保持低水平。近期多个大型监测研究中，均未发现达托霉素或利奈唑胺耐药株[33,35,37]。

CLSI 和 EUCAST 对草绿色链球菌青霉素的解释标准也不相同。CLSI 青霉素和氨苄西林敏感折点分别为≤0.12 μg/ml 和≤0.25 μg/ml[1]。EUCAST 青霉素和氨苄西林敏感折点高一个稀

释度，分别为≤0.25 μg/ml 和≤0.5 μg/ml。草绿色链球菌对青霉素耐药已有报道，血流感染分离株耐药率>50%[38]，尤其是缓症链球菌(*S. Mitis*)、口腔链球菌(*S. oralis*)和血链球菌(*S. sanguin*)。草绿色链球菌对大环内酯类、林可酰胺类和四环素类[33,38-39]、奎奴普丁-达福普汀[38-39]和氟喹诺酮类[33,39]的耐药率亦有报道。解没食子链球菌(*S. gallolyticus*)[40]、缓症链球菌[41]和咽峡炎链球菌(*S. anginosus*)[42]对万古霉素耐药株有个案报道，利奈唑胺耐药菌株偶有报道[43]。草绿色链球菌达托霉素非敏感的 MIC 也曾见过报道[44-46]。一项大型国际血液分离株的研究发现，所有菌株均对替加环素敏感[38]。

(二)参考试验方法

纸片扩散法可用于测定 β-溶血链球菌对青霉素的敏感性，但草绿色链球菌检测结果不可靠，故不可使用[47]。不过，EUCAST 确实提供了青霉素抑菌圈直径的折点作为 β-内酰胺类耐药性的筛选试验。无论是 β-溶血链球菌还是草绿色链球菌，碳青霉烯类、奥利万星、特拉万星和达托霉素只能检测 MIC，而其他药物 MIC 法和纸片扩散法均可。已有报道链球菌对氨基糖苷类的 MIC>1000 μg/ml，但并没有发布可筛选链球菌氨基糖苷类高水平耐药的方法。CLSI 和 EUCAST 推荐 D 试验检测 β-溶血链球菌诱导克林霉素耐药，方法同前述的肺炎链球菌。

(三)商品化试验方法

FDA 批准 Microscan、Phoenix、Sensititre 和 VITEK 2 系统用于链球菌属的测定。非常少的数据显示这些系统除了检测肺炎链球菌外，其他链球菌也能获得可靠的结果[25,48-50]。Etest 法虽然没有得到广泛评估，但仍是参考方法外测定链球菌的另一替代方法[51-52]。

(四)试验和结果报告策略

由于只有零星报道 β-溶血链球菌主要是无乳链球菌对青霉素敏感性降低，因此无需常规检测 β-溶血链球菌的敏感性[31-33,35-37]。然而，如果使用红霉素治疗化脓链球菌引起的感染，并怀疑治疗失败，应考虑测定敏感性。同样，如果克林霉素用于青霉素高度过敏的孕妇预防发生围产期 B 群链球菌感染，应测定克林霉素的敏感性及诱导性耐药试验。对于草绿色链球菌，分离自血液尤其是感染性心内膜炎患者的菌株，应测定青霉素的 MIC。

三、流感嗜血杆菌

(一)耐药性

流感嗜血杆菌(*H. influenzae*)对氨苄西林耐药主要是产生质粒介导的 β-内酰胺酶。TEM-1 型是全球最常见的酶，<5%的菌株产生 *ROB*-1 型 β-内酰胺酶。与 TEM-1 相比，ROB-1 可引起头孢克洛和头孢丙烯敏感性减低[53]。在 β-内酰胺酶阴性氨苄西林耐药(BLNAR)菌株中，青霉素结合蛋白改变也可导致氨苄西林耐药。这主要与编码 PBP 3 的 *ftsI* 基因突变有关，而 PBP 3 是流感嗜血杆菌唯一必需的 PBP[54]。单个 N526K 点突变可导致氨苄西林的 MIC 值升高 2 倍，以及各种头孢菌素 MIC 升高 2~8 倍。虽然其他突变亦有报道，但该突变在 BLNAR 菌株中比较常见[55-56]。与产 β-内酰胺酶的流感嗜血杆菌相比，BLNAR 流感嗜血杆菌对氨苄西林表现为低水平耐药，其 MICs 通常为 0.5~8.0 μg/ml，对阿莫西林/克拉维酸和头孢菌素类如头孢克洛和头孢噻肟的敏感性也稍降低[57-59]。有些菌株具有这种 β-内酰胺类耐药机制同时也产生 β-内酰胺酶，被称为产 β-内酰胺酶阿莫西林-克拉维酸耐药(BLPACR)株[55]。产 β-内酰胺酶流感嗜血杆菌和 BLPACR 菌株对氨苄西林的 MIC 高达 512 μg/ml[55-56]。

美国的一项研究表明，分离自 2008—2010 年的 1545 株流感嗜血杆菌中，27%的菌株 β-内酰胺酶阳性[60]。全球监测研究中，β-内酰胺酶阳性株分离率相近，介于 21.7%~24.0%[61-62]。流感嗜血杆菌中 BLNAR 和 BLPACR 株的分离率报道不一，但世界很多地区 BLNAR 株的分离率出现增长趋势[16,58,63-64]。

流感嗜血杆菌对广谱口服头孢菌素(如头孢克肟和头孢泊肟)和超广谱头孢菌素(如头孢曲松)耐药罕见[60-61,65-66]。按 CLSI≤0.5 μg/ml 敏感折点，美国 487 株儿童患者流感嗜血杆菌分离株对头孢曲松和新型超广谱头孢菌素头孢洛林全部敏感。如头孢洛林按 EUCAST 折点≤0.03 μg/ml，有 7 株头孢洛林不敏感株 MIC>0.03 μg/ml[67]。按

CLSI≤0.5 μg/ml 敏感折点时，2010 年 453 株亚太地区和非洲分离株对头孢洛林均敏感，但若按 EUCAST 折点≤0.03 μg/ml，仅 93.4%的菌株对其敏感[66]。欧洲分离的 515 株流感嗜血杆菌，分别用 CLSI 和 EUCAST 折点，对头孢洛林的敏感率为 100%和 97.7%[65]。上述三项研究中，至少包含 25%的产 β-内酰胺酶菌株。

全球范围内，流感嗜血杆菌对甲氧苄啶-磺胺异噁唑的敏感率为 68%～77%[60-62]，在未分型菌株中耐药可能更为常见[68]。对氟喹诺酮类耐药仍为罕见[60,62,65-66]，但在亚洲一些地区耐药率可能稍高[69,79]。对新型大环内酯类耐药的菌株亦不多见，多个研究结果显示<3% 的菌株对阿奇霉素耐药[60-61,66]。日本研究者也发现 BLNAR 菌株对克拉霉素的敏感性有所降低[71]。

(二)参考试验方法

流感嗜血杆菌中 β-内酰胺酶用产色头孢菌素法、酸度法或碘量 β-内酰胺酶法很容易进行检测(第 75 章)。EUCAST 也推荐青霉素纸片法筛查产 β-内酰胺酶株及 PBP 突变株。抑菌圈直径<12 mm 的菌株应进行 β-内酰胺酶检测[9]。CLSI 建立了肉汤微量稀释法和纸片扩散法测试流感嗜血杆菌，该方法亦可用于副流感嗜血杆菌(见表 76-1)。对不常见的嗜血杆菌包括嗜沫凝聚杆菌(*Aggregatibacter aphrophilus*)[以前的嗜沫嗜血杆菌(*H. Aphrophilus*)和副嗜沫嗜血杆菌(*H. araphrophilus*)]及惰性凝聚杆菌(*Aggregatibacter segnis*)[以前的惰性嗜血杆菌(*H. segnis*)]的检测方法，可参考 CLSI M45-A3 文件[2]。CLSI 推荐使用嗜血杆菌试验培养基(HTM)，以 M-H(Mueller-Hinton)培养基为基础，每毫升添加 15 μg 血红蛋白，15 μgNAD 和 5 mg 酵母提取物。HTM 肉汤由 CAMHB 加上述各种添加物组成，测试磺胺类药物或甲氧苄氨嘧啶时需加入 0.2 U/ml 胸苷磷酸化酶。尽管 HTM 琼脂是透明的，在测量抑菌圈直径和测试某些生长不良的菌株时仍不太容易。HTM 肉汤微量稀释法结果一般更易阅读。最常遇到的问题是某些 β-内酰胺类对 BLNAR 菌株纸片扩散法和肉汤微量稀释法都出现终点判断不明的情况。鉴于此，CLSI 建议 BLNAR 菌株(最好用氨苄西林测试)应视为对阿莫西林-克拉维酸、氨苄西林-舒巴坦、头孢克洛、头孢孟多、头孢他美、头孢尼西、头孢丙烯、头孢呋辛、氯碳头孢和哌拉西林-他唑巴坦耐药[1]。有研究建议使用浓度低于[72] CLSI 推荐的 10 μg 氨苄西林纸片[1]进行检测。EUCAST 建议氨苄西林纸片浓度为 2 μg[9]。EUCAST 也描述了流感嗜血杆菌药敏试验的 MIC 法和纸片扩散法及解释标准，除了培养基为 MH-F 琼脂或肉汤外，其他的和 CLSI 几乎完全相同[9]。研究人员采用纸片扩散法测定 89 株氨苄西林不同耐药机制的流感嗜血杆菌对 12 种 β-内酰胺类的敏感性，β-内酰胺类耐药菌株可以用 EUCAST 纸片扩散法区分，但氨苄西林敏感株和 BLNAR 菌株存在部分重叠[72]。

(三)商品化试验方法

目前，FDA 批准用于测试嗜血杆菌属的稀释法是 Sensititre(赛默飞世尔)和 Etest 法。有研究报道 Etest 法测试 β-内酰胺类的结果比肉汤微量稀释法高[73-75]，提示在检测 BLNAR 和 BLPACR 菌株时需特别引起关注。

(四)试验和结果报告策略

β-内酰胺酶试验可检测流感嗜血杆菌中最常见的也最具临床意义的耐药性。β-内酰胺酶阳性株对氨苄西林和阿莫西林耐药。可用氨苄西林纸片扩散法或 MIC 法检测 BLNAR 株。而检测 BLPACR 菌株时，因其 β-内酰胺酶阳性并对阿莫西林-克拉维酸敏感性下降，需同时进行 β-内酰胺酶检测和阿莫西林-克拉维酸纸片扩散法或 MIC 法。对于未常规开展流感嗜血杆菌药敏试验而 BLNAR 发生率又未知的实验室，应进行药敏试验，至少需测试无菌部位分离菌株对氨苄西林和头孢曲松的敏感性。CLSI 建议常规测试并报告甲氧苄啶-磺胺异噁唑药敏结果[1]。其他口服抗菌药物如阿莫西林-克拉维酸、口服头孢菌素、新型大环内酯类和氟喹诺酮类通常认为对流感嗜血杆菌有活性，常作为呼吸道感染的经验性用药。这些药物通常不需要常规药敏试验。

四、淋病奈瑟菌

(一)耐药性

淋病奈瑟菌(*N. gonorrhoeae*)的耐药性是一

个极为关注的问题，对青霉素、口服头孢菌素、四环素和氟喹诺酮类的耐药性已排除了此类药物作为治疗淋病奈瑟菌感染的主要药物。2015年出现了口服头孢菌素耐药的淋病奈瑟菌，世界各地均有头孢曲松治疗失败病例[76-77]的报道，导致CDC推荐头孢曲松联合阿奇霉素作为治疗非复杂性淋病的唯一治疗方案[78]。欧洲[79]、加拿大[80]、澳大利亚[81]和世界卫生组织[82]的指南也推荐此方案治疗淋病奈瑟菌感染。有限的数据证实超广谱头孢菌素联合阿奇霉素在体内和体外对淋病奈瑟菌均有协同作用[83-84]。不幸的是最近英国证实了一例联合治疗失败的病例[85]，分离菌株对阿奇霉素和头孢曲松均耐药。最近，夏威夷也发现了对阿奇霉素耐药及头孢曲松MIC升高的淋病奈瑟菌群[86]，在美国也开始关注这两种药物治疗淋病奈瑟感染的长期有效性。

淋病奈瑟菌对青霉素耐药机制包括：产质粒介导的TEM-1或TEM-135型β-内酰胺酶[产青霉素酶淋病奈瑟菌(PPNG)]；染色体多位点突变[染色体介导的耐药淋病奈瑟菌(CMRNG)]。CMRNG对青霉素耐药是各种基因突变逐步累加所致。这些突变包括主要的青霉素结合位点PBP 1和PBP 2、膜孔蛋白PorB1b、启动子，以及MtrCDE外排泵转录抑制子编码序列(*mtrR*)等。PPNG产生的TEM型β-内酰胺酶仅限于水解青霉素类[87]，CMRNG可表现出对其他β-内酰胺类敏感性降低。

2007年日本出现对头孢菌素敏感性降低的淋病奈瑟菌[如头孢克肟(MIC≥0.25 μg/ml)和头孢曲松(MIC≥0.125 μg/ml)菌株][88]，现已播散至全球多个国家[89-91]。青霉素耐药CMRNG菌株中编码PBP2的*penA*基因仅有4～8个突变位点，同野生型PBP2相比，头孢菌素MIC升高菌株其嵌合型*penA*基因编码氨基酸多态性超过60个[92]。嵌合型*penA*基因被认为是多个腐生型奈瑟菌*penA*基因DNA重组后产生的。MtrCDE外排泵系统的过度表达和PorB1b膜孔蛋白的突变可导致广谱头孢菌素MIC值升高，且此类菌株中至少存在一个未知的耐药决定因子[92]。已证实口服头孢菌素治疗上述耐药菌株所致感染失败[77]，但注射用头孢曲松仍可保持抗菌活性。淋病奈瑟菌监测项目(Gonococcal Isolate Surveillance Program，GISP)对美国各地性病门诊男性患者尿道分离株进行监测，2011至2015年214株菌株对头孢克肟的敏感性降低(MIC≥0.25 μg/ml)，2015年监测的5147株菌株，0.5%的菌株对头孢克肟MIC≥0.25 μg/ml，远高于野生型菌株的MIC。但同期美国GISP项目仅发现60株头孢曲松敏感性降低的菌株(MIC≥0.125μg/ml)，而2015年监测数据中仅0.2%的菌株对头孢曲松敏感性降低[93]。相比之下，世界卫生组织淋病奈瑟菌抗菌药物监测项目(Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program，GASP)在比利时、丹麦、希腊、挪威、香港、日本、韩国、不丹、印度和印度尼西亚监测的头孢曲松敏感性降低菌株的比例要高的多(如>5%)[94]。

日本[95]、法国[76]和西班牙[96]均有高水平头孢克肟耐药(MIC 8 μg/ml)和头孢曲松耐药(MIC 4 μg/ml)淋病奈瑟菌报道，并提示可能与头孢曲松治疗失败有关。这些菌株含新型嵌合型*penA*等位基因，该等位基因携带独特的突变位点，不同于以往报道的可致超广谱头孢菌素MIC值升高的突变位点[76,97]。尤其是，$PBP2_{A510P}$突变是介导头孢曲松耐药的一个重要因素[97]。将淋病奈瑟菌的嵌合型*PBP2*基因导入野生株，可使头孢曲松MIC值升高500倍[97]。这些菌株，除头孢曲松和头孢克肟外，对四环素类和氟喹诺酮类药物亦耐药，是首次报道的广泛耐药淋病奈瑟菌[97]。体外试验发现厄他培南对上述菌株具抗菌活性，MIC为0.016～0.064 μg/ml，虽然厄他培南对含嵌合型*penA*等位基因菌株的MIC与头孢曲松是平行的，但与携带编码$PBP2_{A510P}$头孢曲松的耐药株还是不同的[98]。

质粒或染色体均可介导淋病奈瑟菌对四环素类耐药，但质粒介导的耐药会导致更高的MIC。喹诺酮耐药决定区(QRDRs)*gyrA*和*parC*的自发突变是淋病奈瑟菌对氟喹诺酮类药物耐药的主要机制。由*mtrR*突变也可引起外排泵介导的耐药；MtrCDE外排泵系统的过度表达亦可导致四环素类和大环内酯类(包括阿奇霉素)的MIC升高。美国2015年GISP项目分离的菌株24.3%对四环素耐药[93]，22.3%对环丙沙星耐药。西太平洋和东南亚地区GASP项目报道，2014年淋病奈瑟菌氟喹诺酮类耐药率较高，部分国家甚至达到90%以上[94]。

淋病奈瑟菌阿奇霉素耐药是多因素造成的。

阿奇霉素 MIC≥2 μg/ml[99] 与 23S rRNA 甲基化或 23S rRNA*rrl* 等位基因突变导致作用靶位改变有关。此外，外排泵如多种药物的 MtrCDE、大环内酯类的 MacA-MacB 和外排泵 *mefA* 的过度表达，在阿奇霉素耐药中均发挥作用[100]。GISP 项目报道阿奇霉素敏感性减低株由 2011 年的 0.3%增至 2015 年的 2.6%表明美国阿奇霉素敏感性减低（MIC≥2 μg/ml）呈增多趋势[93]。近期日本福冈一项研究发现，淋病奈瑟菌阿奇霉素耐药率显著增高，由 2010 年的 1.8%升至 2013 年的 22.6%（此研究阿奇霉素 MIC≥1 μg/ml 定义为耐药）。这种情况大多数与同期阿奇霉素耐药克隆 ST6798 播散所致[101]。而欧洲阿奇霉素敏感率减低与 ST1407 克隆传播有关[102]。2013 年，欧洲 5.4%的分离株是阿奇霉素耐药株（MIC≥2 μg/ml）[103]。

(二)参考试验方法

常规 β-内酰胺酶试验足以检测 PPNG 株，包括产色头孢菌素法、酸度法和碘量法，结果可靠。但是对于淋病奈瑟菌该试验常规临床应用还是有疑义的。CLSI 推荐使用 GC 琼脂做纸片扩散法和琼脂稀释法测定 MIC，EUCAST 则只推荐了 MIC 法。CLSI 推荐的两种方法必须补充 1%的特定生长添加剂，但用琼脂稀释法测试亚胺培南或克拉维酸时，生长添加剂中不能含有半胱氨酸，以避免其对此两种药物抗菌活性的抑制作用[1,104-105]。琼脂稀释法优于肉汤微量稀释法，因为淋病奈瑟菌在液体培养基中有自溶趋势（表 76-1）。

(三)商品化试验方法

目前 Etest 法是唯一可用于淋病奈瑟菌药敏试验的商品化方法，其结果与 CLSI 参考方法琼脂稀释法结果较一致。一项研究发现虽然 295 株淋病奈瑟 Etest 法结果与 CLSI 参考纸片扩散法基本一致，符合率达到 94.6%，但四环素有较大误差[106]。

(四)试验和结果报告策略

一般来说，淋病奈瑟菌临床分离株无须常规进行药敏试验。但 CDC 推荐对疑似使用联合治疗方案失败患者的菌株进行培养和药敏试验[78]。核酸扩增试验（nucleic acid amplification tests，NAATs）在诊断淋病奈瑟菌中的广泛应用，是淋病奈瑟菌药敏试验复杂化，应为该试验无法获得可用于药敏试验的菌株。有研究者采用分子生物学方法检测对淋病奈瑟菌重要的耐药机制，如喹诺酮类、四环素、广谱头孢菌素和大环内酯类耐药机制[107-108]。但不幸的是，由于淋病奈瑟菌的耐药性具有多因素且不断在发展，这些方法的敏感性和特异性不足以满足指导淋病抗菌药物治疗的需求，因而未得到广泛的应用。然而一项研究表明，*gyrA* 基因分型方法成功应用于临床，用于常规检测淋病奈瑟菌阳性临床标本的环丙沙星敏感性[109]。

实验室应至少选择一家可靠的参考实验室来做淋病奈瑟菌药敏试验。受试药物首选头孢曲松、头孢克肟、阿奇霉素、环丙沙星和四环素。虽然还未建立阿奇霉素的临床折点，但 CLSI 已建立了流行病学折点≤2 μg/ml，可区分野生型和非野生型菌株[1]。

五、脑膜炎奈瑟菌

(一)耐药性

青霉素的脑膜炎奈瑟菌（*N. meningitidis*）众数 MIC（modal MIC）为 0.06 μg/ml。但近 20 年来，美国、欧洲和其他地方相继出现了青霉素敏感性降低的脑膜炎奈瑟菌（MIC 0.12～1.00 μg/ml），其发生率在不断增加[110-114]。一项对 2006 至 2010 年来自 19 个拉美国家和加勒比海地区的 4735 株脑膜炎奈瑟菌的研究发现，29.1%的菌株为青霉素中介（MIC 为 0.12～0.25 μg/ml）[111]，亦有 14 株判定为青霉素完全耐药（MIC≥0.5 μg/ml），波兰对 10 年间 1373 株侵袭性感染的脑膜炎奈瑟菌研究发现青霉素中介 14.3%，耐药 1.5%[115]。相反，同期南非 1447 株侵袭性感染的脑膜炎奈瑟菌中，仅 2.8%青霉素中介[110]。编码 PBP 的 *penA* 基因点突变引起 PBP2 基因多态性是导致脑膜炎奈瑟菌对青霉素和氨苄西林敏感性降低的原因[116]。最近美国的一项研究证实在青霉素中介和耐药株中有 63%的菌株发生了 *penA* 基因突变[111]。青霉素 MIC 升高菌株的临床意义还不确定，有病例报道高剂量青霉素成功治疗青霉素敏感性降低菌株所致的感染。两个独立的小组检查了青霉素敏感性降低菌株感染患者的预后，发现与青霉素

MIC 值相比，血清群是最能预测死亡率的微生物参数[117-118]。20 世纪 80 和 90 年代发现几株产 β-内酰酶导致的高水平耐药株，随后十多年来未见新的分离株[116]。

超广谱头孢菌素类（如头孢曲松、头孢噻肟）对青霉素 MIC 升高的菌株仍保持高度抗菌活性[113-114,117]，在发达国家常被用作脑膜炎奈瑟菌脑膜炎的一线治疗药物。但值得关注的是在印度发现了 8 株头孢曲松耐药的 A 群血清型菌株，头孢曲松对这些菌株的 MIC 为 0.25～8 μg/ml[119]。法国近期也报道了头孢曲松和头孢噻肟敏感性降低的菌株，25 株侵袭性感染脑膜炎奈瑟菌 MIC 值升高了 10 倍[120]。

磺胺类药物被用作预防用药，故耐药率较高[110,113-114]；对利福平耐药率较低，但已有药物暴露后发生耐药的报道[111-113,115,121]。一项对不同地区超过 25 年收集的 392 株分离株（其中包括 161 株利福平 MIC>0.25 μg/ml 菌株）的综合研究表明，利福平 MIC>1 μg/ml 的脑膜炎奈瑟菌菌株存在 *rpoB* 等位基因的突变，而所有利福平 MIC≤1 μg/ml 的菌株无此等位基因突变[121]。

最值得关注的是，有些国家氟喹诺酮类药物敏感性降低脑膜炎奈瑟菌的检出率不断增加，环丙沙星对这些菌株的 MIC 一般在 0.125～0.500 μg/ml，而不是高度耐药。其耐药性的产生和淋病奈瑟菌类似，是由于 *gyrA* 基因存在突变[111]。委内瑞拉分离到 1 株对环丙沙星和阿奇霉素（预防用药）耐药的菌株[122]，西班牙也分离了 3 株环丙沙星中介或耐药、利福平耐药的脑膜炎奈瑟菌[123]。

（二）试验和结果报告策略

CLSI 已发布脑膜炎奈瑟菌 MIC 试验标准：使用 CAMHB-LHB 的肉汤微量稀释法或使用 BMHA 的琼脂稀释法，两者都必须在 5% CO_2 条件下孵育[1,104]。对淋病奈瑟菌，EUCAST 只推荐了一种 MIC 法，而没有纸片扩散法标准。

解释标准中列出了可用于治疗脑膜炎奈瑟菌感染的药物如青霉素、头孢噻肟和头孢曲松，也给出了环丙沙星、利福平和阿奇霉素的解释标准，这些药物可作为感染患者密切接触者的预防用药。萘啶酸 MIC 法或纸片扩散法可用于检测氟喹诺酮类敏感性降低的菌株（仅 CLSI）[113]。CLSI 脑膜炎奈瑟菌药敏可采用纸片扩散法，需用 BMHA 琼脂并在 CO_2 条件下孵育，许多药物的检测结果经证实是可靠的[113]。如同 MIC 法，一些治疗和预防用药的解释标准均已列出，但不包括氨苄西林和青霉素，因其纸片扩散法结果不可靠[1,105]。美西林纸片扩散法检测筛选 *penA* 基因多态性菌株可能是例外[113]。

由于缺乏脑膜炎奈瑟菌感染药物治疗失败的病例，所以大多数情况下不必进行药敏试验。虽然 FDA 未批准 Etest 法检测脑膜炎奈瑟菌，但有研究表明 Etest 法仍适合用于脑膜炎奈瑟菌，试验最好使用 BMHA，在 CO_2 条件下孵育[124-125]，然而利福平 Etest 法检测结果不太可靠[125]。

六、潜在生物恐怖病原体

CDC 将某些细菌确定为潜在生物恐怖病原体（https://emergency.cdc.gov/agent /agentlist.asp），包括炭疽芽胞杆菌（*Bacillus anthracis*）、鼠疫耶尔森菌（*Yersinia pestis*）、土拉热弗朗西斯菌（*Francisella tularensis*）、鼻疽伯克霍尔德菌（*Burkholderia mallei*）、类鼻疽伯克霍尔德菌（*Burkholderia pseudomallei*）和布鲁菌属（*Brucella* spp.）。这些菌株抗菌药物敏感性模式大多是可预测的，因此，自然分离菌株往往无需进行药敏试验。但这些菌株中也可能会出现自发性耐药，在生物恐怖事件中，也可能会存在工程化的耐药菌株。为检测任何可能存在的耐药性，CLSI 建立并发布了标准的肉汤微量稀释法和解释标准[2]。

通常治疗炭疽芽胞杆菌、鼠疫耶尔森菌、土拉热弗朗西斯菌、鼻疽伯克霍尔德菌、类鼻疽伯克霍尔德菌和布鲁菌属感染的药物获得性耐药很罕见。不同于其他芽胞杆菌通过产生 *bla*1 和 *bla*2 型 β-内酰胺酶导致青霉素耐药，绝大多数炭疽芽胞杆菌对青霉素敏感。青霉素敏感的炭疽芽胞杆菌可产生抗 σ 因子（*RsiP*），它可封闭 β-内酰胺酶基因转录所必需的 σ 因子。在一株青霉素天然耐药菌株中，*RsiP* 基因单个核苷酸的缺失引起蛋白截短，σ 因子不发生封闭从而导致 β-内酰胺酶基因的转录[126]。然而，只有确定为青霉素敏感株时才推荐阿莫西林作为炭疽预防用药，且仅限于幼童和孕妇[127]。实验室可制备氟喹诺酮类耐药炭疽

杆菌，但未见临床耐药株的报道[128-129]。

马达加斯加报道分离到 2 株自发性耐药的鼠疫耶尔森菌[128-131]。2 株细菌获得接合型质粒。其中一株质粒携带对氨苄西林、氯霉素、四环素、卡那霉素、链霉素和磺胺类耐药的基因，另一株质粒仅携带链霉素耐药基因。对多重耐药的信心，源自最近一项对美洲、非洲和亚洲 17 个国家 392 株鼠疫耶尔森菌的研究，测定了 8 种用于治疗或预防鼠疫的抗菌药物，均未发现耐药株[132]。另一项研究结果显示，从北美分离的 713 株鼠疫耶尔森菌中，未发现类似马达加斯加菌株所携带耐药基因的质粒[133]。

类鼻疽伯克霍尔德菌对多种抗菌药物天然耐药，包括庆大霉素、链霉素、利福平、红霉素和许多 β-内酰胺类[134]。采用 CLSI 解释标准[2]，类鼻疽伯克霍尔德菌和鼻疽伯克霍尔德菌的药敏试验结果显示，大多数菌株对阿莫西林-克拉维酸、头孢他啶、亚胺培南、四环素、多西环素和甲氧苄啶-磺胺异噁唑敏感[135-137]。然而，一些类鼻疽伯克霍尔德菌分离株对头孢他啶 MIC 升高（如 MIC≥8 μg/ml）[136-138]，对阿莫西林-克拉维酸 MIC 升高（如 MIC≥8 μg/ml）[136-138]。A 类 PenA β-内酰胺酶导致对头孢他啶和阿莫西林-克拉维酸耐药[136]。BpeEF-OprC 药物外排泵的过度表达引起甲氧苄啶-磺胺异噁唑耐药。不过甲氧苄啶-磺胺异噁唑耐药罕见，仅泰国一超过 6000 株的研究中 Etest 法报道耐药率为 0.33%[139]。

已有对利福平、甲氧苄啶-磺胺异噁唑敏感性降低的布鲁菌属临床分离株的报道[140-143]。这些报道中药敏测试方法要么没有明确说明，要么不同于目前 CLSI 推荐的方法。最近伊朗的一项研究中，57 株马耳他布鲁菌药敏试验采用 Etest 法但没有用专门的培养基，35.1%的菌株对利福平敏感性下降，3.5%的菌株对甲氧苄啶-磺胺异噁唑敏感性下降[144]，而且耐药菌株也没有分析耐药机制或突变。但是，已在体外布鲁菌突变株中检测到 *rpoB* 基因（利福平作用靶位点）的突变[145-146]。

已证实产 β-内酰胺酶的土拉热弗朗西斯菌，对 β-内酰胺类包括头孢菌素和碳青霉烯类耐药[147-150]。未见对氨基糖苷类、四环素类、氟喹诺酮类和氯霉素耐药株的报道。

炭疽芽胞杆菌、鼻疽伯克霍尔德菌、类鼻疽伯克霍尔德菌和鼠疫耶尔森菌，在肉汤微量稀释法常用的培养基和孵育条件下都能生长良好（表 76-2）。但是，土拉热弗朗西斯菌药敏试验推荐培养基是 CAMHB 添加 2%特定生长因子，这种含半胱氨酸的特定生长因子和淋病奈瑟菌药敏试验所用 GC 琼脂培养基的添加物是相同的。一些布鲁菌属细菌，尤其是牛布鲁菌，需要在 CO_2 条件下孵育。但是 CO_2 环境下孵育可能会提高氨基糖苷类药物的 MIC，降低四环素的 MIC。药敏板在 CO_2 环境下孵育，链霉素敏感折点提高一个稀释度（如从 8 μg/ml 提高到 16 μg/ml）[2,151]。土拉热弗朗西斯菌、鼠疫耶尔森菌和布鲁菌属细菌为慢生长微生物，其充分生长可能需孵育至 48 h。

很少有研究比较标准 CLSI 参考肉汤微量稀释法和其他替代药敏试验方法。一项研究比较炭疽芽胞杆菌 Etest 法和肉汤微量稀释法[152]，除青霉素外，两种方法头孢曲松、氯霉素、环丙沙星、克林霉素、红霉素、利福平、四环素和万古霉素 MIC 值相差均在一个倍比稀释度内，青霉素 Etest 法 MIC 值低于肉汤微量稀释法。一项研究比较炭疽芽胞杆菌 Etest 法和琼脂稀释法，青霉素 MIC 值也出现类似的趋势[153]。上述研究结果表明，除了青霉素，其他药物炭疽芽胞杆菌药敏试验 Etest 法都是可接受的。最近在 26 株鼠疫耶尔森菌药敏测试中发现，除氯霉素和 TMP-SMX，Etest 法测定环丙沙星、多西环素、庆大霉素、左氧氟沙星、链霉素和四环素的结果都是可靠的[154]。Hemarajata 等[155]用 VITEK 2 检测到一株对四环素和 TMP-SMX 假耐药的类鼻疽伯克霍尔德菌。

除常规表型方法外，Weigel 等[156]结合改良肉汤微量稀释法和实时定量 PCR 测定炭疽芽胞杆菌对环丙沙星和多西环素的敏感性，与标准孵育时 16～20 h 相比，仅用 6 h 即可获得可靠的结果。其他学者也用包括焦磷酸测序和单核苷酸多态性（SNP）PCR 等分子生物学方法，测定炭疽芽胞杆菌、鼠疫耶尔森菌和土拉热弗朗西斯菌对环丙沙星的耐药性[157-158]。基于 SNP 的 PCR 方法也被用于这 3 种微生物对多西环素耐药性的检测[158]。

对潜在生物恐怖病原物进行药敏试验应关注临床微生物实验室的生物安全。上述所有微生物至少需要二级生物安全水平（BSL2）的操作、控制及设施。可能产生潜在气溶胶的活动应在 BSL3 条件下进行[159]。由于药敏试验接种物制备时可能产生气溶胶，所有操作必须在 BSL3 设施内进

行。如果实验室不具备 BSL3 设施，应将分离株送到 CDC 协调的实验室网络内配备相应设施的参考实验室(http://www.selectagents.gov/)。

七、乏养菌属和颗粒链菌属

乏养菌属和颗粒链菌属对多种抗菌药物包括青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类、大环内酯类、林可酰胺类、氟喹诺酮类和四环素类均有耐药的报道。CLSI M45-A3 指南中有青霉素、氨苄西林、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢曲松、亚胺培南、美罗培南、万古霉素、红霉素、克林霉素、环丙沙星、左氧氟沙星和氯霉素的折点，这些折点均引用自草绿色链球菌。

三篇近期的文献评估了乏养菌属和颗粒链菌属的药敏模式[160-162]。这些研究中，按照 CLSI 折点，11%～24%的缺陷乏养菌(*Abiotrophia defectiva*)、34%～39%的毗邻颗粒链菌(*Granulicatella adiacens*)、80%～100%的苛养乏养菌(*Granulicatella elegans*)对青霉素敏感。美国心脏协会(AHA)感染性心内膜炎指南推荐根据青霉素 MIC 值治疗乏养菌属和颗粒链菌属引起的心内膜炎。但这些指南青霉素敏感折点与 CLSI 不同。AHA 指南建议青霉素 MIC≤0.12 μg/ml 者可单用青霉素治疗，而青霉素 MIC 为 0.25 μg/ml 者可能需要联合庆大霉素治疗，MIC≥0.5 μg/ml 者则必须联合庆大霉素治疗。CLSI 青霉素折点分别为敏感≤0.12 μg/ml，中介 0.25～2.00 μg/ml，耐药≥4 μg/ml。

头孢曲松对缺陷乏养菌、毗邻颗粒链菌和苛养乏养菌的敏感性分别为 92%～100%、22%～47%及 90%～100%[160-162]。青霉素敏感的缺陷乏养菌一般对头孢曲松也敏感(95%～100%)，但青霉素敏感的毗邻颗粒链菌仅 21%～65%对头孢曲松敏感。相反，青霉素耐药的缺陷乏养菌对头孢曲松通常是敏感的(90%～97%)，而青霉素耐药毗邻颗粒链菌很少对头孢曲松敏感(5%～14%)[160-162]。头孢噻肟和头孢吡肟也可见到相同的趋势[161]。尽管有非敏感株的报道(MIC≥1μg/ml)，但乏养菌属和颗粒链菌属通常对美罗培南敏感。缺陷乏养菌对美罗培南几乎全是非敏感株，MIC_{90} 0.25～1.00 μg/ml[161-162]。其他药物的敏感性各有差异，如红霉素 24%～52%，克林霉素 77.3%～100%，左氧氟沙星 91.6%～100%[160-162]。目前尚无万古霉素耐药的报道。虽然达托霉素未建立临床折点，但许多毗邻颗粒链菌和缺陷乏养菌具有较高的 MIC 值，MIC_{90} 范围在 0.5～1.0 μg/ml 之间[160,162]，苛养乏养菌对达托霉素较敏感，尽管 MIC_{90} 范围在 0.5～21.0 μg/ml，而 3 种细菌利奈唑胺 MIC_{90} 范围在 1～2 μg/ml 之间[160-162]。

由于乏养菌属和颗粒链菌属是苛养菌，建议药敏试验时使用补充 0.001% 盐酸吡哆醛的 CAMHB-LHB，并在大气环境下培养(表 76-3)[2]。尽管氨基糖苷类常和细胞壁活性药物如青霉素或万古霉素用于联合治疗，但不推荐测定乏养菌属和颗粒链菌属氨基糖苷类的药敏。目前针对乏养菌属和颗粒链菌属药敏尚无商品化系统。Namdari 等[163] 描述了一种用 Prompt 系统和 Microscan 革兰阳性板，在接种物中添加吡哆醛的方法。Alberti 等[164] 研究发现，在 MHA 巧克力琼脂上用 Etest 法检测青霉素、头孢曲松和万古霉素敏感性与在添加了吡哆醛的 CAMHB-LHB 上肉汤微量稀释法检测结果间的一致性很差。

八、气球菌属

CLSI 和 EUCAST 均建立了气球菌属的药敏折点[9]。CLSI 折点除 TMP-SMX 来自葡萄球菌属外，其余均采用草绿色链球菌折点[2]。每种抗菌药物 CLSI 和 EUCAST 间均存在差异。此外，测试方法也有差异。CLSI 仅描述了肉汤微量稀释法：用 CAMHB-LHB 肉汤，在 35℃ 5% CO_2 环境下孵育 20～24 h。而 EUCAST 推荐纸片扩散法：使用 MHF 琼脂，在 35℃ 5% CO_2 环境下孵育 16～20 h(表 76-3)。

气球菌属敏感性数据大多数为尿气球菌(*Aerococcus urinae*)和栖血气球菌(*Aerococcus sanguinicola*.)。一般来说，这 2 种细菌对青霉素都敏感[165-166]。偶见栖血气球菌和浅绿色气球菌(*Aerococcus. viridans*)青霉素不敏感株[167-168]。对于 CLSI 气球菌属折点，搜集的数据包括洛杉矶加利福尼亚大学和梅奥诊所的 70 株浅绿色气球菌，仅 64%的分离株对青霉素敏感，224 株栖血气球菌中 95%为青霉素敏感株[167]。同样，尿气球菌和栖血气球菌中，青霉素敏感，头孢烯、碳青霉烯

类不敏感分离株也有报道[165-166,169]。由气球菌属引起的严重感染如心内膜炎一般用青霉素和一种氨基糖苷类药物联合治疗。尽管有尿气球菌高水平氨基糖苷类耐药的报道[171]，但体外研究显示这种联合对一些尿气球菌有协同作用和杀菌效应[170-172]。

氟喹诺酮类存在种特异性差异。有报道显示，尿气球菌氟喹诺酮类药物的敏感性在 67%～84%之间[166,168-170]。而栖血气球菌则低得多，在 22%～35%之间[167-168]。氟喹诺酮耐药与 gyrA 和/或 parC 基因置换有关[173]。体外用含高浓度胸腺嘧啶脱氧核苷的培养基(如绵羊血培养基)测试时，尿气球菌对 TMP-SMX 是耐药的。但是，使用 CLSI 方法，用 LHB 培养基时，大多数菌株敏感[174]。因为 LHB 培养基含有内源性的胸苷磷酸化酶，可将胸腺嘧啶脱氧核苷转化为胸腺嘧啶，体外实验可恢复对 TMP-SMX 的活性。尿气球菌以外的气球菌属细菌携带可编码高亲和力叶酸转运结合蛋白的 *folT* 基因，该基因可使细菌结合外源性叶酸，产生类似于肠球菌的 TMP-SMX 耐药。人类尿和血液中胸腺嘧啶脱氧核苷水平通常较低，但其水平在饮食中叶酸摄入量较高的患者中可能较高[174]。因此，CLSI 建议不论体外药敏结果如何，尿气球菌(其他气球菌属细菌除外)均报告对 TMP-SMX 耐药[2]。研究表明，栖血气球菌对 TMP-SMX 的敏感性为 70%，浅绿色气球菌为 60%[167-168]。

用于治疗尿路感染的其他抗菌药物的数据很有限。Hirzel 及其同事使用非标准化方法进行评估(如在 BMHA 上进行 Etest 检测)，使用 EUCAST 折点，发现 52 株尿气球菌 100%对呋喃妥因敏感，磷霉素 MIC_{90} 32 μg/ml[169]。韩国[175]和中国[176]曾有过携带 *vanA* 基因的耐万古霉素浅绿色气球菌的个案报道。虽然无达托霉素临床折点，但 Hirzel 等[171]通过杀菌时间实验评估两株临床分离株，发现达托霉素具有杀菌活性。

目前气球菌属尚无商品化测试方法。许多研究在 BMHA 上使用 Etest 法进行测试，但该法未经 CLSI 或 EUCAST 参考方法验证。无菌部位如血液或深部组织标本的分离株应考虑进行药敏试验。CLSI 推荐测试青霉素、头孢曲松和万古霉素。虽然已经有高水平氨基糖苷耐药的报道，但标准化测试方法还未建立。

九、气单胞菌属

气单胞菌属通常对氨苄西林耐药，对 β-内酰胺类酶抑制剂合剂敏感性不定，对窄谱头孢菌素耐药[177-180]。已有气单胞菌属产可诱导型 β-内酰胺酶的报道，可在 β-内酰胺类治疗中出现耐药[181]。气单胞菌属细菌可产金属 β-内酰胺酶，如一株分离自匈牙利患者的携带 bla_{VIM-4} 基因整合子的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)[182]和一株分离自法国患者的携带 bla_{IMP-19} 基因质粒的豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)[183]。金属 β-内酰胺酶 *CphA* 基因也大多存在于除豚鼠气单胞菌外的嗜水气单胞菌、威隆气单胞菌(*A. veronii*)、简达气单胞菌(*A. jandaei*)、杀鲑气单胞菌(*A. salmonicida*)和达卡气单胞菌(*A. dhakensis*)中[184-185]。对携带 *cphA* 基因的碳青霉烯耐药菌株的检测比较困难，因为这些菌株通常体外试验对碳青霉烯类敏感[184]。

气单胞菌引起的感染在中国台湾较多见。1996 年分离 234 株细菌对抗菌药物的敏感性存在种差异性，其中，温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)的敏感性高于嗜水气单胞菌和豚鼠气单胞菌[178]。西班牙 Vila 等[179] 2002 年也发现类似结果。一般认为气单胞菌对氟喹诺酮类药物敏感[178]。氟喹诺酮类耐药率在亚太地区增长迅速，已从 2003 至 2006 年的 8%增长到 2007 至 2010 年的 17%，增长幅度超过 1 倍[186]。气单胞菌对氟喹诺酮类的耐药与 *gyrA* 和 *parC* 上的 QRDR 突变相关[187-188]。美国曾报道 2 例接受水蛭治疗时发生环丙沙星耐药嗜水气单胞菌感染的病例，患者都曾接受过环丙沙星预防性治疗[189-190]。

虽然气单胞菌可以引起腹泻，但其所致的健康人群腹泻一般可自愈无须治疗[179,191]，不推荐对粪便分离株进行常规药敏试验[2]。但是气单胞菌可以引起其他各种感染，需要治疗[178-180]。因此对肠外分离株需要进行药敏试验。气单胞菌的生长特征和肠杆菌科细菌相似，CLSI 推荐其药敏试验同肠杆菌科细菌纸片扩散法或肉汤微量稀释法。

十、芽胞杆菌属

除炭疽芽胞杆菌外，其他芽胞杆菌属细菌是

临床实验室常见的污染菌，但特定条件下也可引起严重的疾病，如导管相关性感染、创伤感染和角膜溃疡等。由于芽胞杆菌属的药敏谱变化较大，因此无菌部位或严重难治性感染所分离的芽胞杆菌可考虑进行药敏试验。芽胞杆菌属细菌可产β-内酰胺酶，导致其对青霉素类耐药并可能对头孢菌素类耐药。蜡样芽胞杆菌在临床标本中最常见，大多数分离株对青霉素和广谱头孢菌素均耐药，但是青霉素耐药并不能预测头孢菌素耐药[153]。对氨基糖苷类、红霉素、克林霉素、氯霉素、四环素、氟喹诺酮类、TMP-SMX，甚至万古霉素均有耐药的报道[153,192-194]。在对不同临床样本中分离的70株芽胞杆菌的测试中发现，达托霉素对生长期细胞有活性而对芽胞无活性[192]。曾报道1例经美罗培南治疗的致命脓毒症患者和1例经头孢吡肟治疗的肺炎患者出现碳青霉烯耐药蜡样芽胞杆菌感染[195-196]，但两例的耐药机制尚不明确。

非苛养菌标准药敏试验方法可用于芽胞杆菌属，CLSI推荐肉汤微量稀释法，见表76-3[2]。使用MHA的琼脂稀稀法和Etest法所得的头孢噻肟、环丙沙星、红霉素、庆大霉素、青霉素、四环素和万古霉素结果比较接近[153]。因结果不一致，故不推荐检测β-内酰胺酶预测芽胞杆菌对青霉素敏感性。

十一、弯曲菌属

氟喹诺酮类通常用于治疗空肠弯曲菌（*Campylobacter jejuni*）和大肠弯曲菌（*Campylobacter coli*）所致的消化道感染，在美国过去20年中，从人类和动物分离的这2种菌株对其耐药率呈上升趋势。国家抗菌药物耐药监测系统（NARMS）指出，1990年尚未发现人源空肠弯曲菌环丙沙星耐药株[197]，2007年耐药率达峰值26%，2013年耐药率已达22.3%[198]。2013年NARMS报道34.5%的大肠弯曲菌对环丙沙星耐药，动物来源分离菌株的耐药性可能和动物饲料中添加大环内酯类及氟喹诺酮类药物作为促生长剂有关，其耐药性可传给人源分离的菌株[199]。由于人源分离菌株对氟喹诺酮类药物耐药率的不断增长，2004年美国FDA推翻了之前的批复，禁止将氟喹诺酮类药物恩诺沙星作为治疗用兽药。其他国家的研究结果表明，禁止作为兽药使用后，家禽弯曲菌属对氟喹诺酮类的耐药率维持不变[200]，表明该举措对弯曲菌属氟喹诺酮类耐药率的影响很微弱[201]。

不同于大肠埃希菌和沙门菌需要*gyrA*基因QRDR的多个突变才能获得高水平喹诺酮耐药，弯曲菌属只需*gyrA*基因T85I的单一突变，就可产生高水平萘啶酸和氟喹诺酮类耐药[202]。尽管鸡感染弯曲菌属模型已证实该突变与耐药率的增高是相关的[201]，但人们并不认为弯曲菌属氟喹诺酮耐药株的感染比敏感株所致的感染更严重[203]。同环丙沙星相比，NASR数据显示，2013年仅2.0%的空肠弯曲菌和2.7%的大肠弯曲菌红霉素耐药，而四环素耐药株分别达49.1%和17.6%[198]。

由于耐药率的不断增加，对严重疾病患者或长期带菌者分离株必须进行药敏试验，出于流行病学目的分离株也应进行药敏试验。CLSI和EUCAST推荐[2]药敏试验应用CAMHB-LHB肉汤微量稀释法并在微需氧大气环境下孵育，见表76-3。纸片扩散法CLSI推荐使用BMHA琼脂而EUCAST推荐MHF琼脂。对环丙沙星、红霉素和四环素的结果CLSI和EUCAST都提供了稀释法、纸片扩散法的解释标准。CLSI对多西环素稀释法也提供了折点，而EUCAST推荐用四环素预测多西环素的敏感性[2]。Baker的研究表明，Etest法与琼脂稀释法测定环丙沙星、红霉素、四环素的结果相关性较好[204]。

目前，对除空肠弯曲菌和大肠弯曲菌外的弯曲菌属细菌，尚无药敏试验方法或解释标准。

十二、棒杆菌属和棒状杆菌

棒杆菌属（*Corynebacterium* spp.）细菌的药敏谱差别较大，许多菌株高度敏感[205-209]。但大多数无枝菌酸棒杆菌（*C. amycolatum*）、杰氏棒杆菌（*C. Jeikeium*）、多耐棒杆菌（*C. resistens*）和解脲棒杆菌（*C. urealyticum*）对常用于治疗革兰阳性菌感染的药物，包括青霉素类、头孢菌素类、大环内酯类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类、四环素类和克林霉素表现为多重耐药。最近有1例达托霉素耐药纹带棒杆菌（*C. striatum*）分离株引起感染性心内膜炎的病例报道，患者曾因耐甲氧西林金黄色

葡萄球菌菌血症和骨髓炎使用达托霉素治疗 12 周[210]。最近一份研究报道显示，纹带棒杆菌对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类、大环内酯类和氟喹诺酮类等大多数药物耐药，对万古霉素和利奈唑胺全敏感。起初 98%的菌株对达托霉素敏感，但孵育 24 h 后，所有菌株表现为不敏感[211]，这表明在治疗过程中可能会出现耐药。大多数解脲棒杆菌对氟喹诺酮类耐药，而氟喹诺酮类是经验性治疗该菌引起尿路感染的重要药物[207,212]。临床分离的棒杆菌属对大环内酯类耐药常见，主要与 *ermX* 甲基化酶基因的存在有关[213]。

白喉棒杆菌（*C. diphtheriae*）很少对重要抗菌药物耐药，仅有极少数抗菌药物非敏感株的报道[214-216]。一项对世界各地分离的 410 株菌株的大型研究发现，仅 5 株对大环内酯和酮内酯类药物敏感性降低[214]。但也有青霉素对白喉棒状杆菌杀菌活性差的报道。意大利研究者发现 24 株咽炎或扁桃体炎患者分离的非产毒素白喉棒杆菌中 17 株对青霉素耐受[217]。测定阿莫西林对 2 株心内膜炎患者的非产毒素白喉棒杆菌的敏感性时，发现了一个矛盾的结果（如随着抗菌药物浓度的升高，杀菌活性降低）[218]。研究者推断用青霉素类治疗白喉棒杆菌性心内膜炎时，高剂量青霉素类杀菌活性反而降低而导致疗效反应差[218]。有报道称，最近自马约特岛患者分离到 1 株白喉棒杆菌生物变种仅对叶酸途径抑制药甲氧苄氨嘧啶、磺胺甲基异噁唑和复方新诺明耐药[219]。2011 年加拿大报道了第一例多重耐药株，来自去过印度旅游的一患者的脚趾脓肿。该菌株对大环内酯类、四环素和 TMP-SMX 耐药，对三代头孢菌素中介，而且泰利霉素和氯霉素 MIC 较高[216]。

棒杆菌属不同细菌生长特性有所差异，以前的研究中使用了多种方法、培养基和孵育条件进行药敏试验。CLSI 推荐药敏试验用 CAMHB-LHB 肉汤微量稀释法，大气环境下孵育（表 76-3）。某些菌株孵育 24 h 后生长良好，但其他菌株需 48 h 才能充分生长。48 h 的孵育时间对 β-内酰胺类药物的检测尤为重要。如细菌生长不理想或孵育 24 h 对 β-内酰胺类敏感的，推荐继续孵育至 48 h 后再判读结果[2]。如果生长充分，其他药物可 24 h 后报告结果。目前，CLSI 不推荐用纸片扩散法做棒杆菌属细菌的药敏试验。稀释法和纸片扩散法 EUCAST 均提供了解释标准。纸片扩散法推荐使用 MHF 琼脂，如细菌生长充分，可在孵育至 16～20 h 或 40～44 h 时开始判读结果。有研究者发现 Etest 法检测棒杆菌属细菌的药敏结果比较满意[205,215,220]。CLSIM45-A3 推荐的试验方法和结果报告策略也适用于其他棒杆菌，包括隐秘杆菌属（*Arcanobacterium*）、节杆菌属（*Arthrobacter*）、短杆菌属（*Brevibacterium*）、纤维单胞菌属（*Cellulomonas*）、纤维微菌属（*Cellulosimicrobium*）、皮杆菌属（*Dermabacter*）、雷弗森菌属（*Leifsonia*）、微杆菌属（*Microbacterium*）、厄氏菌属（*Oerskovia*）、罗思菌属（*Rothia*）包括黏滑罗氏菌（*Rothia mucilaginosa*）、储珀菌属（*Trueperella*）和苏黎世菌属（*Turicella*）[2]。文献中关于这些细菌的药敏数据较少，而且不同研究采用的药敏方法不一样。短杆菌属、皮杆菌属和苏黎世菌属大环内酯类耐药株以及短杆菌属和皮杆菌属氟喹诺酮类耐药株都有报道[207]。溶血隐秘杆菌（*Arcanobacterium haemolyticum*）普遍对甲氧苄啶-磺胺异噁唑耐药[221]，有些分离株对四环素耐药[222]。对其他药物敏感可考虑用于治疗，不过青霉素临床治疗失败曾见报道[221]。研究发现溶血隐秘杆菌和骚动厄氏菌（*Oerskovia turbata*）质粒上携带 *vanA* 基因，两种菌均对万古霉素耐药[223]。50 株微杆菌属临床分离株显示不同的药敏结果，值得注意的是，只有 56%的菌株对环丙沙星敏感，有 1 株抵抗微杆菌（*Microbacterium resistens*）（该属模式菌种）对万古霉素耐药[224]。耳炎苏黎世菌（*Turicella otitidis*）对大多数 β-内酰胺类、环丙沙星、利福平、四环素和庆大霉素敏感，但有报道对与 23S rRNA 突变相关的大环内酯类、林可酰胺类有显著的耐药性[225-226]。从正常无菌部位分离的棒杆菌属和其他棒状杆菌需要进行药敏试验。

十三、猪红斑丹毒丝菌

猪红斑丹毒丝菌（*Erysipelorthrix husiopathiae*）对万古霉素天然耐药。其他药物如氨基糖苷类和甲氧苄啶-磺胺异噁唑对其无活性或活性很差。对许多不同来源分离的猪红斑丹毒丝菌药敏结果显示，所有菌株对青霉素类、头孢菌素类、碳青霉烯类和氟喹诺酮类敏感[227-229]。也有克林霉素、红霉素和四环素耐药菌株的报道。日本一

项对66株猪分离菌株的研究显示，94%的菌株对红霉素敏感[228]。最近一项研究表明，对大环内酯类药物耐药是由于其3.7 kb的质粒上携带*erm*(T)基因[230]。四环素耐药性已有文献报道，一项研究的66株分离株中，77%的菌株四环素MIC≥8 μg/ml[228]。既往研究显示，四环素MIC升高菌株中*tetM*基因呈阳性[231]。4株临床分离株达托霉素对MIC≤0.125 μg/ml[232]。

猪红斑丹毒丝菌苛养，肉汤微量稀释法推荐使用CAMHB-LHB[2]。也有使用MHA琼脂稀释法补充或不补充5%马血的报道[227-229]。无菌部位分离的菌株，实验室应首先测试氨苄西林或青霉素[2]。

十四、孪生球菌属

有限的文献数据表明孪生球菌属(*Gemella* spp.)对许多抗菌药物包括青霉素敏感。CLSI最近为其建立了药敏折点。加州大学洛杉矶分校，梅奥诊所和爱荷华州大学对45株孪生球菌分离株的数据表明，青霉素和头孢曲松敏感性为95%，美罗培南为98%，万古霉素为96%。相比之下，红霉素敏感性为56%[233]。孪生球菌属青霉素或万古霉素与庆大霉素或链霉素在体外具有协同作用[234]。

孪生球菌是苛养菌，肉汤微量稀释法推荐使用CAMHB-LHB[2]。细菌生长充分约需孵育48h。CLSI为青霉素、头孢噻肟、头孢曲松、美罗培南、万古霉素、红霉素、左氧氟沙星和克林霉素均提供了折点。无菌部位分离的菌株，实验室应首先测试青霉素、头孢噻肟或头孢曲松和万古霉素[2]。

十五、HACEK群

HACEK群细菌{如凝聚杆菌属(*Aggregatibacter*)[以前的嗜血杆菌属(*Haemophilus*)和放线杆菌属(*Actinobacillus*)的嗜沫群]、心杆菌属(*Cardiobacterium*)、艾肯菌属(*Eikenella*)和金氏菌属(*Kingella* spp.)}的药敏试验数据有限，部分原因是这些细菌临床很少分离到且较难培养。一项研究显示，174株HACEK群细菌中104株(59.8%)未能在CAMHB-LHB中生长，另特别提出83.3%的伴放线凝聚杆菌(*A. actinomycetemcomitans*)、60.7%的嗜沫凝聚杆菌(*A. aphrophilus*)和60%的人心杆菌(*Cardiobacterium hominis*)生长不良[235]。

HACEK群对超广谱头孢菌素和氟喹诺酮类敏感，尽管有时分离的伴放线凝聚杆菌、人心杆菌、侵蚀艾肯菌(*Eikenella corrodens*)和金氏菌(*Kingella* spp.)产生β-内酰胺酶[235]，但体外试验对氨苄西林和青霉素往往是敏感的[47,235-236]。Coburn团队研究结果显示，68株HACEK群分离株中22.9%的菌株对青霉素不敏感，但95.8%的菌株对氨苄西林敏感，除2株细菌外所有菌株对阿莫西林-克拉维酸敏感。1株青霉素和氨苄西林耐药侵蚀艾肯菌用头孢硝噻吩纸片法检测β-内酰胺酶，结果呈阴性[235]。美国心脏协会建议，治疗由HACEK群细菌引起的感染性心内膜炎时，应视氨苄西林为耐药，除非细菌生长良好足以获得药敏结果[237]。

金氏金氏菌(*Kingella kingae*)β-内酰胺酶是由$bla_{TEM\text{-}1}$基因编码，该基因可位于染色体或质粒上[238]，并且仅存在于金氏金氏菌独特的克隆。美国分离自侵袭性感染的15株细菌20%携带$bla_{TEM\text{-}1}$基因，冰岛的14株分离株中28.6%携带此基因，但是以色列190株分离株中仅1.1%携带，加拿大($n=24$)、法国($n=56$)和西班牙($n=32$)携带率为0[239]。根据已建立的临床折点，EUCAST对159株金氏金氏菌进行评估，结果41株(26%)产β-内酰胺酶，产β-内酰胺酶株同时也对甲氧苄啶-磺胺异噁唑耐药[240]。金氏金氏菌克林霉素MIC范围0.2～0.5 μg/ml，因此EUCAST定义该菌对克林霉素天然耐药[240]，这是对克林霉素作为儿科骨骼感染经验治疗的挑战。在EUCAST研究中，8%的分离株对四环素耐药，与其他细菌一样，四环素的敏感性可预测多西环素的敏感性。

CAMHB-LHB肉汤微量稀释法可用于HACEK群药敏试验。一些分离株需孵育48 h阳性对照孔才有足够的浊度，这是其生长充分的直接证据。凝聚杆菌属细菌在HTM肉汤中生长良好，而艾肯菌属在添加了维生素K_1、血红素、5%裂解马血的布鲁菌肉汤生长良好。CLSI M45-A3文件允许用这两种肉汤作为标准CAMHB-

LHB的替代培养基[2]。EUCAST仅建立了金氏金氏菌使用MHA的纸片扩散法和MIC法的折点[9]。正常无菌部位分离的HACEK群应进行药敏试验和检测β-内酰胺酶[2]，尽管实验室已知β-内酰胺酶试验并不能检测所有的氨苄西林耐药菌株[235]。

十六、幽门螺杆菌

(一)耐药性

幽门螺杆菌(*H. pylori*)对糖肽类、多黏菌素、萘啶酸、甲氧苄啶和磺胺类天然耐药。推荐的一线治疗药物对幽门螺杆菌的耐药率有很大差异，甲硝唑最高，其次为克拉霉素和左氧氟沙星。对阿莫西林、四环素类耐药率很低[241]。

美国已不再常规监测幽门螺杆菌的耐药性，故耐药情况不明。最近一份研究评估了2009至2013年135名退伍军人幽门螺杆菌感染情况，研究发现克拉霉素耐药率17.8%，甲硝唑21.5%，左氧氟沙星为31.3%，四环素0.8%，此人群中未见阿莫西林耐药幽门螺杆菌[242]。欧洲2008至2009年2204株幽门螺杆菌中，克拉霉素耐药率17.5%，左氧氟沙星耐药率为14.1%，甲硝唑为34.9%[243]。通常，甲硝唑、克拉霉素的耐药率与幽门螺杆菌的血清阳性率及抗菌药物使用量有关[243]。例如，北欧国家门诊喹诺酮和大环内酯类药物使用率较低，很少见到对左氧氟沙星和克拉霉素耐药的幽门螺杆菌[243]。类似情况如2002至2005年，日本3707例幽门螺杆菌仅4%对甲硝唑耐药，这可能与该国很少使用甲硝唑有关[244]。对每位患者而言，甲硝唑和克拉霉素的前期治疗会增加对这些药物耐药的风险[245]。

(二)参考试验方法

CLSI幽门螺杆菌采用琼脂稀释法测定MIC。培养基为MHA添加5%绵羊血(≥2周)，存旧绵羊血更容易生长，不能使用新鲜的绵羊血。挑取血琼脂平板上培养72 h的菌落，配成接种物终浓度10^5 CFU/点。细菌需在35 ℃类似于弯曲菌属所需的气体发生系统产生的微氧环境下培养3天。质控菌株为幽门螺旋杆菌ATCC 43504，目前仅有克拉霉素的解释标准。其他抗菌药物亦在研究中，CLSI有质控范围的药物包括阿莫西林、甲硝唑、泰利霉素和四环素[2]。基于流行病学cut-off值，EUCAST已定义了甲硝唑、克拉霉素、阿莫西林、左氧氟沙星、四环素和利福平的MIC解释标准，这些标准和许多评估幽门螺杆菌耐药性的研究很类似。唯一例外的是阿莫西林，其MIC＞0.12 μg/ml判定为耐药(HTTP://www.EUCAST.org)，而许多研究则将＞1 μg/ml判定为耐药。虽然目前CLSI还没有甲硝唑的解释标准，但许多研究者都将MIC＞8 μg/ml定义为耐药。CLSI M45-A3文件提醒，使用CLSI参考MIC稀释法，幽门螺杆菌甲硝唑敏感性结果不能可靠预测疗效，故不推荐使用[2]。欧洲幽门螺杆菌研究小组公布了类似于CLSI法的琼脂稀释法，且建议用补充马血的MHA和更高浓度的接种物[246]。克拉霉素是最常用的治疗药物，虽然纸片扩散法没有标准化，但Grignon等已经证明，其测试克拉霉素的结果可靠[247]。由于特定基因的点突变与耐药性关系密切，亦可使用基因型方法，尤其对克拉霉素[248]。

(三)商品化试验方法

虽然FDA并无批准幽门螺杆菌药敏试验的商品化方法，但部分研究者已研究了Etest法的试验性能。由于方法学上存在显著差异如培养基类型、接种物浓度、培养条件等各不相同，对Etest法的评价较为复杂[246,249-250]。在两个大型研究报道中，甲硝唑琼脂稀释法和Etest法结果有显著差异[251]。Etest制造商现建议幽门螺杆菌测试甲硝唑时，应使用交替孵育条件，如先在厌氧环境中孵育24 h，再在微需氧环境孵育48 h(Etest包装说明书，2012，生物梅里埃)。在厌氧环境下预孵育能显著提高Etest法与琼脂稀释法结果的一致性[252]，不过此研究中琼脂稀释法采用的是添加5%马血而存旧绵羊血的MHA培养基。一些研究评价了Etest法测定克拉霉素耐药性与23S突变检测法的优劣性，结果显示耐药表型和基因型之间并不一致[253]。

(四)试验和报告结果策略

幽门螺杆菌生长要求特殊，药敏试验条件复杂，测试药物有限，临床常规实验室很难开展药敏试验。但是由于其对甲硝唑和克拉霉素显著耐药，在特定条件下需要进行测试，如再次感染治疗

失败的患者，应选一个可靠的参考实验室。耐药株在整个胃的分布不均匀，单一活检样本分离株的测试结果可能无法代表整个菌群[251,254]。药敏试验结果指导幽门螺杆菌感染疗效的数据各不相同。目前幽门螺杆菌感染处理的 Maastricht V / Florence 共识报告指出，三联疗法失败的患者，应进行培养和药敏试验[255]，而美国胃肠病学会指南不建议进行常规试验，因为美国缺乏可用的商品化试剂[256]。

十七、乳杆菌属、片球菌属和明串珠菌属

片球菌属（*Pediococcus* spp.）、明串珠菌属（*Leuconostoc* spp.）和大多数乳杆菌属（*Lactobacillus* spp.）细菌对万古霉素天然耐药。加氏乳杆菌（*Lactobacillus gasser*）、德氏乳杆菌（*L. delbrueckii*）和嗜酸乳杆菌（*L. acidophilus*）可能对万古霉素敏感[257-260]。

乳杆菌属细菌对哌拉西林-他唑巴坦、亚胺培南、红霉素和克林霉素的 MIC 一般较低，但青霉素、头孢菌素 MIC 则有所差异[257-261]。在一项对 85 株血液分离株的研究中，药物敏感性较低的干酪乳杆菌（*L. casei*）和鼠李糖乳杆菌（*L. rhamnosus*）青霉素 MIC 为 0.06～4.00 μg/ml，头孢曲松的 MIC 为 0.25～256.00 μg/ml[260]。氟喹诺酮类药物对大多数乳杆菌属细菌的抗菌活性差[257-258,260-261]。

明串珠菌属通常对克林霉素、红霉素、青霉素敏感，MIC 值一般＜0.5 μg/ml[261-263]。头孢曲松 MIC 从 1～128 μg/ml，对亚胺培南 MIC 升高（＞0.5 μg/ml）和美罗培南 MIC 升高（＞8 μg/ml）者亦有报道[261-263]。明串珠菌属达托霉素的 MIC 较低（＜0.5 μg/ml），利奈唑胺 MIC 为 2～8 μg/ml[264]。

片球菌属通常对红霉素和克林霉素敏感[259,261-262,265]，但也有耐药株[262]。有报道 49 株菌株青霉素 MIC_{90} 为 0.5 μg/ml[259]，但有些菌株对青霉素 MIC 值可高达 2 μg/ml[262]。头孢曲松 MIC 一般≥16 μg/ml，但大多数菌株对亚胺培南非常敏感（MIC＜0.25 μg/ml）[261-262]。片球菌属对环丙沙星耐药[261-262,265]。庆大霉素仅用于联合治疗，对上述 3 种菌属的抗菌活性有所差异[259,261-262,265]。

CLSI 建议片球菌属、乳杆菌属、明串珠菌属肉汤微量稀释法的培养基为 CAMHB-LHB（表 76-3）[2]。EUCAST 将乳杆菌菌属作为革兰阳性厌氧菌，仅提供其解释标准。琼脂稀释法药敏试验既可使用不含添加成分的 MHA，也可使用 BMHA[261]，但必须在 5%CO_2 条件下孵育以使其充分生长。

十八、单核细胞增生李斯特菌

单核细胞增生李斯特菌（*Listeria. monocytogenes*）临床分离株对常用药物包括氨苄西林（或青霉素）和甲氧苄啶-磺胺异噁唑保持敏感。除了表达 *tetM* 或 *tetS* 的菌株偶尔对四环素耐药，以及具主动外排介导的菌株对环丙沙星耐药外[266]，单核细胞增生李斯特菌对在体外具有抗革兰阳性菌活性的药物包括氯霉素、万古霉素和大环内酯类药物一般敏感[266-267]。达托霉素 MIC 升高（MIC_{90} 为 4 μg/ml），利奈唑胺 MIC 为 1～2 μg/ml[267]。单核细胞增生李斯特菌体外药敏试验可能对头孢菌素类药物敏感，但临床治疗无效。法国对 1989 至 2007 年临床分离的 4668 株单核细胞增生李斯特菌的药敏进行了评价[268]，发现仅 61 个菌株对至少一种临床相关抗菌药物耐药，最常见的是四环素（耐药率为 0.7%）和环丙沙星（耐药率为 0.4%）。然而，最近一些研究报道，从食品和食品加工环境中分离出单核细胞增生李斯特菌对临床相关抗菌药物的耐药率在增加[268]。已发现商业化食品生产设施中使用的消毒剂苯扎氯铵是导致细菌主动外排系统过度表达的主要原因[269]。最近的一项研究表明，在荷兰患有李斯特菌性脑膜炎的成年人中，治疗失败的比率正在上升。这些病例与对消毒剂敏感性下降的单核细胞增生李斯特菌 ST6 菌株的出现有关。与野生型菌株相比，ST6 菌株携带季铵盐耐受的多药外排蛋白 *Emr*，庆大霉素（0.125 mg/L）和阿莫西林（0.25 mg/L）的 MIC 升高[270]。

李斯特菌感染一般以经验治疗为主，通常无需进行药敏试验。CLSI 指南只列出了氨苄西林和青霉素敏感的折点（MIC≤2 μg/ml），EUCAST 折点则略有不同，氨苄西林、青霉素敏感株敏感折

点为 MIC≤1 μg/ml，耐药折点为>1 μg/ml[9]。药敏试验 CLSI 推荐使用 CAMHB-LHB，EUCAST 推荐 MH-F。必须注意的是，头孢菌素的药敏试验无须测试也无须报告，因为某些分离株的 MIC 值如头孢曲松可低至 8 μg/ml，显示假敏感[271]。由于头孢菌素类经常作为脑膜炎的经验用药，实验室无论何时涂片或培养发现可疑李斯特菌时应迅速向临床报告。

十九、微球菌属

有限的文献数据中表明微球菌属（*Micrococcus* spp.）对许多抗菌药物敏感，尽管也有 β-内酰胺类和红霉素耐药的报道[272-273]。最近 CLSI 为微球菌属细菌建立了折点，可用于库克菌属（*Kocuria*）、涅斯捷连科菌属（*Nesterenkonia*）、皮生球菌属（*Dermacoccus*）和皮肤球菌属（*Kytococcus* spp.）。

微球菌属分离株可常规用 CAMHB、在大气环境[2]下进行药敏试验。CLSI 提供了青霉素、万古霉素、红霉素和克林霉素的折点。无菌部位分离株实验室应首先测试青霉素和万古霉素[2]。

二十、卡他莫拉菌

除外不耐受青霉素酶的青霉素类，卡他莫拉菌（*M. catarrhalis*）对所有治疗其所致感染的药物一直保持高度敏感。超过 90% 的卡他莫拉菌产生 β-内酰胺酶，对阿莫西林、氨苄西林和青霉素耐药[16,60,65,69,274]。这些菌株对常用于治疗卡他莫拉菌感染的阿莫西林-克拉维酸仍然敏感。

大多数临床分离株产 1～2 种 β-内酰胺酶：BRO-1 或 BRO-2[274-275]。2 种酶都是由染色体基因编码，表型相同且与膜相关。产 BRO-1 菌株比产 BRO-2 菌株更常见，产 BRO-1 菌株对氨苄西林和青霉素 MIC（如≥4 μg/ml）通常高于产 BRO-2 菌株（如≤0.5 μg/ml）[274-276]。BRO-2 对 β-内酰胺酶不稳定青霉素类的作用临床意义未知。有研究者报道，中国台湾地区 11 家医院分离的 314 株菌株中，TMP-SMX 耐药率为 18.5%[274]，中国 19 家医院 140 株分离株耐药率为 11.4%[59]，但大多数研究中甲氧苄啶-磺胺异噁唑耐药率不到 5%[60,65,274-275]。大环内酯类和四环素类耐药率普遍较低（2009 至 2011 年西半球分离株不到 1%）[61,66,69,274]。亚太地区分离的菌株对克拉霉素和四环素的耐药率分别为 7.6% 和 3.2%，绝大多数不敏感株来自中国[277]。最近一份中国的研究报道四环素耐药率为 16.4%[59]。

卡他莫拉菌 β-内酰胺酶检测，仅产色头孢菌素法可靠[278]。产酶菌株检出率较高，所以无须常规开展 β-内酰胺酶试验。但也有主张报告 β-内酰胺酶，强调卡他莫拉菌对治疗呼吸道感染的常用药物（如阿莫西林）往往无反应。不检测 β-内酰胺酶而报告 MIC 结果会出现问题，因为 β-内酰胺酶阳性株和阴性株对氨苄西林和阿莫西林的 MIC 有部分重叠。卡他莫拉菌对常用药物敏感，除 β-内酰胺酶试验外很少做其他药敏。CLSIM45-A3 文件中描述了卡他莫拉菌 MIC 法药敏试验[2]。CLSI M45-A3 推荐采用 MHA 的纸片扩散法，在 5% CO_2 环境下孵育，测定阿莫西林-克拉维酸、阿奇霉素、克拉霉素、红霉素、四环素和甲氧苄啶-磺胺异噁唑的药物敏感性（表 76-3）。EUCAST 为卡他莫拉菌提供了 MIC 法和纸片扩散法的折点。不同于 CLSI 指南，EUCAST 提供了 MIC 法折点（≤1 μg/ml）（译者注：原文如此）。此外，萘啶酸纸片扩散法可用于筛选氟喹诺酮类的敏感性：萘啶酸敏感株可视为对环丙沙星、左氧氟沙星、莫西沙星和氧氟沙星敏感[2]。

二十一、巴斯德菌属

人源巴斯德菌属（*Pasteurella* spp.）细菌通常对青霉素敏感，MIC≤0.5 μg/ml[279-280]。人感染 β-内酰胺酶阳性（用头孢硝噻吩纸片法测试）菌株的零星报道发现，这些菌株对阿莫西林的 MIC 为 8～64 μg/ml，阿莫西林-克拉维酸的 MIC 为 0.25～1.00 μg/ml[281]。巴斯德菌属一般对治疗急性细菌性皮肤和皮肤结构感染的抗菌药物较为敏感：最近一项对分离自动物咬伤患者的 156 株分离株的研究表明，头孢唑啉、头孢曲松、氨苄西林-舒巴坦、厄他培南、阿奇霉素、多西环素和甲氧苄啶-磺胺异噁唑的 MIC 很低[282]。尚未发现临床分离株对注射用头孢菌素、氟喹诺酮类、四环素类、氯霉素或甲氧苄啶-磺胺异噁唑的耐药株[279-280]。某些菌株可能对红霉素耐药，因为

至少目前有1例猫咬伤患者最后发展成脑膜炎，但红霉素治疗失败的报道[283]。

CLSI推荐对巴斯德菌属药敏试验采用BMD法和纸片扩散法(表76-3)。同样，EUCAST也提供了MIC法和纸片扩散法的指南。由于缺乏不敏感株的数据，除红霉素外，其他测试药物只有敏感解释标准。相反，EUCAST提供了巴斯德菌的耐药解释标准，而且根据青霉素结果可推断氨苄西林和阿莫西林的敏感性。此外，和卡他莫拉菌一样，萘啶酸纸片扩散法可用于筛选氟喹诺酮类的敏感性[283]。

通常只需对正常无菌部位分离菌株进行药敏试验，β-内酰胺酶试验也只需检测这些菌株和呼吸道分离株[2]。咬伤伤口感染通常进行经验性药物(如阿莫西林-克拉维酸)治疗，这些药物已覆盖多种可能引起感染的微生物，故不必进行药敏试验。

二十二、黏滑罗氏菌

文献中黏滑罗氏菌(*Rothia mucilaginosa*)药敏数据有限。已有β-内酰胺类、克林霉素、红霉素和氟喹诺酮类耐药的报道[272]。最近梅奥诊所的一份研究显示，黏滑罗氏菌药敏试验用MHA-LHB琼脂稀释法较为困难，仅1/4的分离株可见充分生长。这些菌株青霉素(9/9)和万古霉素(13/13)全部敏感[284]。

黏滑罗氏菌是苛养菌，药敏试验需在添加血液的培养基中才能获得充分生长。CLSI推荐使用CAMHB-LHB[2]。CLSI提供了青霉素、万古霉素、红霉素、克林霉素、左氧氟沙星和甲氧苄啶-磺胺异噁唑的折点。无菌部位分离株，实验室应首先测试青霉素和万古霉素[2]。

二十三、弧菌属

无论是霍乱弧菌还是其他弧菌属(*Vibrio species.*)细菌，对大多数抗菌药物包括新型头孢菌素、氨基糖苷类、氟喹诺酮类和四环素类都是敏感的；但是也可能会出现对其中一种或多种药物耐药的情况[285]。

在部分发展中国家，随着地理区域和年份的变化，霍乱弧菌(*V. cholerae*)的耐药率有较大差异。常用治疗药物四环素类、氟喹诺酮类和甲氧苄啶-磺胺异噁唑的耐药株均有报道[286]。通常认为多重耐药霍乱弧菌与R质粒上携带的基因元件有关[287]，而耐药整合元件SXT编码针对甲氧苄啶、磺胺甲基异噁唑和链霉素，在多起暴发流行的霍乱弧菌中都检测到该元件[285,288]。中国1961至2010年550株霍乱弧菌O1群El Tor生物型的药敏结果显示，耐药率明显增加：甲氧苄啶-磺胺异噁唑从0上升至38.5%，四环素从0上升至89%，萘啶酸从0上升至45.9%[289]。与此相比，中国1993至2009年340株O139群霍乱弧菌药敏试验结果显示高耐药率：萘啶酸83.1%，四环素83.4%，阿奇霉素50.3%，甲氧苄啶-磺胺异噁唑90.7%[290]。最近发现自1例印度儿童霍乱弧菌El Tor Ogawa型分离菌株，携带有*bla*DHA基因和*bla*NDM-1基因，Etest法和琼脂稀释法结果显示其对三代头孢菌素均耐药[291]。

在一项评价阿奇霉素、环丙沙星疗效的随机双盲对照研究中，阿奇霉素治疗的97例患者中细菌学清除率为78%，而环丙沙星治疗的98例患者中仅为10%。这些患者分离的168株菌株用纸片扩散法和Etest法进行测试，阿奇霉素和环丙沙星均敏感，但是91株O1群霍乱弧菌对环丙沙星MIC为0.25 μg/ml，明显高于野生型菌株的MIC[292]。升高的MIC和治疗不佳提示以MIC≤1 μg/ml作为环丙沙星敏感折点，可能存在某些耐药机制的漏检。实际上，2010年海地O1群霍乱弧菌暴发时就检测到环丙沙星敏感性下降菌株(0.25～1.00 μg/ml)，这与QRDR(喹诺酮类药物耐药决定区)的*gyr*A和*par*C基因突变有关[293]。

从2009年起，CDC每年还跟踪监测除霍乱弧菌外其他弧菌属细菌的耐药性。在每年研究中，提交给CDC测试的最主要细菌是副溶血性弧菌(*V. parahaemolyticus*)，其次为溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)和创伤弧菌(*V. vulnificus*)，其他菌种不到50株。2014年，溶藻弧菌对氨苄西林耐药率为97.6%，而副溶血性弧菌耐药率为47.8%，创伤弧菌为2.5%。受试的弧菌属细菌中无头孢他啶、喹诺酮类或四环素耐药株，对甲氧苄啶-磺胺异噁唑耐药率仅0.2%[294]。

霍乱无须抗菌药物治疗，但抗菌药物治疗可缩短病程，减轻疾病严重程度。同样，非霍乱弧菌属细菌可以引起腹泻，但健康个体的腹泻无须治

疗亦会自愈。如果弧菌引起严重感染，则应进行药敏试验。CLSI 建议采用肉汤微量稀释法或纸片扩散法，检测条件同肠杆菌科细菌。对嗜盐弧菌，有研究建议使用含1%氯化钠的 MHA 平板。CLSI 推荐纸片扩散法和肉汤微量稀释法分别用 MHA 和 CAMHB(两者都不添加氯化钠)，接种物菌悬液用0.85% 氯化钠制备[2]。

二十四、结论

除严重的链球菌感染、肠外气单胞菌属或弧菌属感染、器械相关性棒状杆菌感染外，本章讨论的许多苛养菌引起的感染，通常都采用经验性治疗，它们对选择的药物一般均敏感，无须进行药敏试验。特殊情况如临床治疗失败、患者对选择的药物不耐受，或感染严重而可供选择的药物有限时，可能需要进行药敏试验。此外，药敏试验可能有助于种属鉴定(如区分杰氏棒杆菌与其他棒杆菌属细菌)。临床医生不确定是否需进行苛养菌药敏试验时，应鼓励其咨询感染科医生或药剂师。

与严重感染相关的苛养菌通常需要进行药敏试验，MIC 结果往往比定性结果更有价值。纸片扩散法仅用于有 CLSI 或 EUCAST 解释标准的细菌。重要的是，实验室工作人员应熟悉苛养菌的各种药敏方法、优点和局限性。若必须进行药敏试验，应由已验证过这些药敏方法的实验室来完成。

参考文献请扫二维码查阅

第77章　抗菌药物敏感性试验方法：厌氧菌*

AUDREY N. SCHUETZ, DARCIE E. CARPENTER

（孙自镛　译；余方友　审校）

厌氧病原菌能引起严重的感染，特别是在医院环境中，抗菌药物是主要的治疗手段。与需氧菌一样，厌氧菌的耐药问题日益严重[1]。但是，对临床微生物学家和临床医生而言，确定引起感染的厌氧病原菌的抗菌药物耐药性比需氧菌更加困难。这些困难主要包括对病原菌属或种的鉴定不充分、普遍存在的厌氧菌和需氧菌的混合感染、厌氧菌的重命名和重分类、缺乏共识性的药敏试验方法，以及建立药敏结果判断折点的机构对判断标准和结果解释的不一致。因为厌氧菌生长缓慢且苛养，所以药敏试验难以开展。临床常在药敏试验结果出来之前，就开始对感染进行经验性治疗。因此，关于改变抗菌药物的治疗如何影响感染进程，几乎没有客观结论。

16S rDNA PCR、DNA 测序和基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）等分子和蛋白质组鉴定方法的最新应用，使临床实验室对样本的鉴定从一般类别（如革兰阳性厌氧球菌）升级到病原菌属和种的鉴定。MALDI-TOF MS 对厌氧菌的鉴定方法比过去有限的基于表型或生物化学的方法，更快速，且准确性和特异性更高。可以预见，厌氧菌在人类感染中的作用将越来越受关注。在临床微生物学实验室中，越来越多的厌氧菌被认为是潜在的病原菌，并且分类学的改变正在迅速推动这一领域的发展。因此，许多以前归为一类的病原菌（如放线菌属 *Actinomyces* spp. 和 *Actinotignum* spp.）由于抗菌药物敏感试验方法的不同而重新归类，这进一步强调了对厌氧菌进行抗菌药物敏感性试验的重要性。过去针对药敏的研究受到同一形态组学（如革兰阳性厌氧球菌）下各个不同属的分类的某些限制。

厌氧菌的耐药性在全球范围一直增长，特别是在拟杆菌属（*Bacteroides* spp.）中[2]。对抗菌药物敏感性的研究表明，耐药情况因地理位置而异，不仅在国家之间，而且在同一国家内，甚至在同一地区的不同医院之间也存在差异。所以增加对厌氧菌的药敏试验变得越来越重要。以前针对抗菌药物敏感性的研究是有限的，但是回顾此类研究有助于临床微生物学家预测某些微生物随时间推移可能出现的耐药趋势。除拟杆菌属和副拟杆菌属（*Parabacteroides* spp.）外，一些研究不适当地将肉汤微量稀释法用作其他多种厌氧菌的药敏试验。有些研究使用纸片扩散法进行厌氧菌药敏试验，而这种方法的判断折点目前没有得到相关机构的批准。最后，还有一些研究采用商品化的琼脂梯度扩散法做厌氧菌药敏试验，但在接种物浓度、琼脂培养基类型或终点判读时间方面未遵循产品说明书的要求。

除了检测方法的细节外，了解所使用的折点也很重要，因为不同机构可能对同一试验设置不同的折点（表 77-1）。例如，如果使用欧洲抗菌药物敏感性试验委员会（EUCAST）折点而非美国临床和实验室标准协会（CLSI）的折点，那么对厄他培南的耐药率可能更高。折点不同的原因部分是由于收集用于设置折点的数据时使用的测试方法不同，以及折点数据的解释存在差异。CLSI 和 EUCAST 都在不断重新评估厌氧菌的折点。因此，使用 CLSI 和 EUCAST 的最新版本很重要。2018年，CLSI降低了厌氧菌对哌拉西林-他唑巴坦

*本章包含 Audrey N. Schuetz 和 David W. Hecht 在本手册第 11 版第 75 章中呈现的部分内容

表 77-1　EUCAST 和 CLSI 耐药性折点差异示例

抗菌药物	微生物	EUCAST 耐药折点	CLSI 耐药折点
青霉素	革兰阳性和革兰阴性厌氧菌	>0.5 mg/L[a]	≥2 μg/ml
哌拉西林-他唑巴坦	革兰阳性和革兰阴性厌氧菌	>16/4 mg/L[a]	≥128/4 μg/ml
厄他培南	革兰阳性和革兰阴性厌氧菌	>1 mg/L[a]	≥16 μg/ml
甲硝唑	革兰阳性和革兰阴性厌氧菌，除艰难拟梭菌	>4 mg/L[b]	≥32 μg/ml

注：[a] 不包括艰难拟梭菌，以前称为艰难梭菌，因为该菌无折点；[b] EUCAST 中艰难拟梭菌对甲硝唑耐药性折点为>2 mg/L

的敏感和中介的折点。因此，当在自己的机构的药敏谱(antibiogram)或文献中评估随时间推移的耐药率时，读者应密切注意所使用的特定折点。在本章中，除非另有说明，否则均使用 CLSI 折点。

厌氧菌存在获得性耐药，也存在基于染色体的固有耐药。所有厌氧菌都认为对氨基糖苷类药物耐药，因为氨基糖苷类药物不能到达其目标核糖体。厌氧菌不具备摄入氨基糖苷类药物需要氧或氮依赖的电子传递[3]。厌氧菌也认为对磷霉素、氨曲南和甲氧苄啶天然耐药。喹诺酮类药物环丙沙星和左氧氟沙星由于靶点渗透性差和对靶酶的亲和力低，所以对厌氧菌一般无效，而氟喹诺酮类药物莫西沙星具有良好的抗厌氧菌活性。特定的厌氧菌和抗菌药物固有耐药性组合将在本章作专门介绍，如放线菌属(*Actinomyces* spp.)对甲硝唑耐药。

本章概述药敏试验方法，强调每种方法的优缺点，汇总 4 类厌氧病原菌(革兰阴性杆菌、革兰阳性产芽胞杆菌、革兰阳性非产芽胞杆菌和厌氧球菌)中主要抗菌药物的药敏数据。每组耐药性增加的相关趋势有所注明。有关药敏试验方法和结果报告的具体建议也作了综述。

一、药敏试验方法和质控

(一)参考试验方法

1. 琼脂稀释法　琼脂稀释法(又称 Wadsworth 法)由 CLSI 推荐为厌氧菌的参考药敏试验方法[4]，评估其他药敏试验方法的有效性时，都是与琼脂稀释法比较。琼脂稀释法是将倍比稀释的抗菌药物加入熔化的琼脂中，倾入培养皿，待其凝固。使用接种装置将多达 36 种厌氧菌分离株的标准接种物点种到琼脂表面。一旦接种物被琼脂吸收，将平皿倒置并在厌氧条件下孵育。大约孵育 48 h 后，肉眼观察平皿上细菌生长情况。MIC 值是抗菌药物抑制细菌生长的最低浓度。由于琼脂稀释法耗时、费力且需要专业的技能知识。所以常规临床微生物实验室难以将其作为厌氧菌的常规药敏试验方法。表 77-2 概述了琼脂稀释法的优缺点。

表 77-2　厌氧菌药敏试验方法

方法	培养基	接种物	孵育时间(h)	优点	缺点
琼脂稀释法[a]	布氏血琼脂	10^5 CFU/点	48	参考方法，同时检测多个菌株对某种抗菌药物的敏感性	费力；专业知识要求高；不便于检测单个菌株；含抗菌药物平皿效期有限
微量肉汤稀释法[b]	强化布氏肉汤	10^5CFU/ml (10^5/孔)	48	经济；RUO 板有售；同时检测单个菌株对多种抗菌药物的敏感性	某些菌株生长不良；仅限于检测拟杆菌属和副拟杆菌属
琼脂梯度稀释法	布氏血琼脂	1.0 麦氏浊度	24～48	便于单个菌株检测；可同时检测单个菌株对多种抗菌药物的敏感性；保质期长；易使用	用于监测或检测大量抗菌药物费用高昂；如果厌氧环境维持不当，甲硝唑的耐药性可能高估
β内酰胺酶纸片	不适用	一环微生物	0.5	结果快速	仅检测β内酰胺酶类；若为阴性，则需检测 MIC 预测青霉素、氨苄西林和阿莫西林敏感性

注：[a] 可用商品化培养基；[b] 可购买仅限研究使用(research use only, RUO)的冻干板

(1)培养基:推荐选择几乎所有厌氧菌都生长的强化布氏血琼脂培养基[5]。布氏琼脂高压灭菌前,添加氯化血红蛋白(5 μg/ml)和维生素 K_1(1 μg/ml),待培养基冷却到 48～50℃时,立即加入 5%(体积分数)裂解绵羊血。关于该培养基的详细制备及成分可参见 CLSI 的 M11 文档[4]。氯化血红蛋白、维生素 K_1 和裂解绵羊血储存液可以提前制备。这些储存液的贮存条件和保质期在 M11 中均有详细说明[4]。应使用 20 ml 的终体积制备 15 mm×100 mm 的平板。含有 17 ml 布氏琼脂、血红素和维生素 K_1,不含溶解血的预备琼脂高压灭菌后,可在 4～8℃下保存达 1 个月。使用时,将预备琼脂融化,然后在水浴中冷却至 48～50℃,加入溶解绵羊血(1 ml)和抗菌药物稀释液(2 ml)后,轻轻颠倒 2 次以混合试管内容物,再将培养基倒入培养皿(15 mm×100 mm)中。方形培养皿配制过程与此相似,不同的是,25.5 ml 布氏琼脂中加入 1.5 ml 裂解羊血和 3 ml 抗菌药物稀释液。混合和倾倒过程中应避免产生气泡。静置 15～20 min,待琼脂凝固后,将培养皿倒置,盖子半开置于培养箱或层流通风橱中干燥 30 min。向熔化的预备琼脂培养基中加入 2 ml 无菌蒸馏水或缓冲液,制备不含抗菌药物的质控平板,用作各种抗菌药物之间的厌氧及需氧对照。除非通过合格的抗菌药物试验确认方可延长储存时间,否则平板应在配制当天使用。

(2)接种物准备:可挑取布氏血琼脂平板上培养 24～72 h 后的 5 个或以上菌落悬浮于布氏肉汤或其他浅色肉汤培养基中,制备成 0.5 麦氏(McFarland)浊度的菌悬液,也可以将菌落接种于巯基乙酸盐或适于厌氧菌生长的其他营养肉汤培养基中,孵育 4～24 h,直至达到 0.5 麦氏浊度(可能需要稀释)。孵育时间取决于所接种的菌悬液浓度和待测菌种的生长速度。0.5 麦氏浊度可以通过光度计测定或与 Wickerham 卡目测比较。某些肉汤培养基可能会影响光度计读数,推荐使用校准光度计。

(3)接种步骤:使用可重复的接种装置(也称为 Steer's replicator)将样品盘(32～36 孔)中的菌悬液接种于琼脂表面,每点约接种 0.001 ml (10^5 CFU)(多点接种器;CMI-Promex,Pedricktown,NJ)[6]。脆弱拟杆菌(*B. fragilis*)和多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)在琼脂上的最终接种菌量为每点 10^5 CFU。菌体较大的菌种,如艰难拟梭菌(以前称为艰难梭菌)接种量低至 $1\log_{10}$。菌体较小的菌种,如韦荣球菌(*Veillonella* spp.)和微小微单胞菌(*Parvimonas micra*),接种量更高。只要在不含抗菌药物质控板上有足够的菌落生长,这些变化不会影响 MIC 值。先接种不含抗菌药物的质控平板。在接种含抗菌药物平板时,从药物浓度最低的平板开始,以药物浓度最高的平板结束。应该做好标记以便保证平板的正确朝向,通常以印度墨笔标记其中一个孔。通过接种不含抗菌药物的质控板并在有氧环境下培养监测接种过程中是否有需氧菌的污染。

尽管 CLSI 文件 M11[4]要求尽可能减少孵育前暴露时间,琼脂稀释板也可以在有氧环境中接种。接种后,放置 10～15 min 待菌液吸收,再将平板倒置以防止冷凝水滴落至菌落表面。应在接种 30 min 内将平板放入厌氧环境。应当指出,不同的厌氧菌对氧气的敏感性各不相同。一些菌种,如脆弱拟杆菌,对氧气较耐受,而另一些菌种,如梭杆菌属,则对氧气敏感。对氧气高度敏感的厌氧菌,高压灭菌后的所有步骤均应在厌氧条件下进行。

(4)孵育条件:琼脂稀释平板应置于厌氧罐或其他厌氧环境中,(36±1)℃孵育 42～48 h。同时需加入厌氧指示剂进行监测。

(5)质量控制:质量控制程序旨在监测药敏试验过程的准确度和精密度,包括操作过程、试剂和设备性能及检测人员的资质。CLSI 文件 M100 列出了厌氧质控菌及其 MIC 范围[7]。必须通过质量控制保证所有新的培养基均能满足待测菌生长的需要,以及抗菌药物在运送或保存过程中未变质。每次检测均应包括质控。

如果采用生长方法准备接种物,则应将无菌的单纯肉汤接种到琼脂上。该质控有助于结果判读。因为培养基残留很难与生长不良区分开。

建议定期进行菌落计数和接种物的纯度检查。应至少每季度进行菌落计数,以确保接种物准备的熟练程度。如果不经常进行厌氧菌药敏试验,则每次试验均应进行菌落计数。菌落计数时,从生长对照孔中取 10 μl 于 10 ml 盐水(1∶100)中稀释(译者注:原文是 10 μl、10 ml、1∶100,应该是 1∶1000),再取 0.1 ml 铺种于非选择性厌氧血琼

脂平板进行厌氧培养。100～200个菌落生长表明接种量为(1～2)×10^6 CFU/ml。从生长对照孔中吸取少量菌液接种到血琼脂平板一个象限，在需氧条件下孵育以检测需氧菌污染，以及接种到厌氧血琼脂板在厌氧条件下孵育。

琼脂稀释法每次应使用两种质控菌株。所选的两个质控菌株的预期MIC范围应在被检测抗菌药物浓度范围内。在选择要检测的质控菌株时，选择浓度范围内的MIC值比选择与待测菌种属接近的质控菌株更为重要。例如，当检测迟缓埃格菌(*Eggerthella lenta*)对克林霉素的敏感性时，选择多形拟杆菌(*B. thetaiotaomicron*)ATCC 28741作为质控菌株优于迟缓埃格菌(*E. lenta*)ATCC 43055，尽管后者与待测菌同种。CLSI规定厌氧菌对克林霉素的MIC折点为：敏感≤2 μg/ml，中介4 μg/ml，耐药≥8 μg/ml。多形拟杆菌质控范围为2～8 μg/ml，在被检测抗菌药物折点范围内。而迟缓埃格菌的质控范围为0.06～0.25 μg/ml，不涵盖折点范围，在这种情况下不适合用作质控菌株。

迟缓埃格菌ATCC 43055已显示出MIC可变性，因此，该质控菌株对某些抗菌药物的MIC范围尚未确定[4]。检测革兰阳性厌氧菌时，可以选择一种或几种革兰阴性菌作为质控。

(6)结果解释：琼脂稀释试验终点是指与生长对照相比，变化最明显的最低抗菌药物浓度[4]。此变化定义为无生长或微弱生长、雾状、多个细小菌落，或1个到多个正常大小的菌落。少数菌落可能是平板接种过程中相邻菌株"飞溅"的结果，也可能是在该特定抗菌药物浓度下仅少数菌落生长的结果。当检测某些革兰阴性菌对β内酰胺类药物敏感性，尤其是头孢唑肟和哌拉西林时，终点可能难以解释，梭杆菌属更为困难。因为许多梭杆菌属细菌产生L型(细胞壁缺损的细菌不典型形态)，在琼脂表面呈透明雾状生长，这种现象甚至在认为敏感的β内酰胺类药物高浓度平板上出现。各种终点判读可参见CLSIM11彩图，并且以此作为该检测方法的补充指南[4]。在确定MIC时，将含抗菌药物板与不含抗菌药物对照板进行比较非常重要，因为不同种类的厌氧菌在琼脂表面的形态学各不相同，有黏液状和不透明的，如脆弱拟杆菌属(*B. fragilis*)，也有灰色和透明的，如解脲弯曲菌(*Campylobacter ureolyticus*)。

重要的是要牢记肉汤和琼脂稀释法已知的固有误差，通常是正负2个稀释倍数。由于这种误差，已经为某些抗菌药物设置了中介的解释类别，以防止小的、不可控制的技术因素导致解释方面的重大差异。

厌氧菌解释分类和折点参见CLSI M100表2J[7]。EUCAST也发布了解释分类和折点，该折点与CLSI有所不同(www.eucast.org)。EUCAST未指定厌氧菌药敏试验方法。因此，EUCAST发布的厌氧菌MIC数据可以是琼脂稀释法、肉汤微稀释法和其他方法，例如琼脂梯度扩散条法的组合。

2. 微量肉汤稀释法 与琼脂稀释法不同，微量肉汤稀释法采用倍比稀释来检测抗菌药物的耐药性。向塑料微量稀释盘或板的锥形或圆形无菌孔中加入一系列倍比稀释的含抗菌药物肉汤培养基，再接种标准量的细菌到每个孔内。MIC的判定方法与琼脂稀释法相似。与琼脂稀释法相比，微量肉汤稀释法有许多优势，如省力、少量分离菌同时检测多种抗菌药物、平板可提前制备并冷冻。

目前，CLSI仅确认并批准此法用于检测拟杆菌属(*Bacteroides* spp.)和副拟杆菌属(*Parabacteroides* spp.)[4]。Hastey等[8]证明了与标准琼脂稀释法相比，艰难拟梭菌肉汤微稀释法产生的MIC会有负偏差(例如，通过肉汤微稀释法测定的MIC比琼脂稀释法测定的MIC低至少2倍)。使用厌氧条件分离脆弱拟杆菌以外的菌种，以及使用预先还原的肉汤MIC盘，可以改善该方法的检测结果，但是这些研究仍在进行中，还需要其他研究来确认除拟杆菌属和副拟杆菌属以外其他微生物的微量肉汤微稀释法的可靠性。表77-2概述了微量肉汤稀释法，包括其优缺点。

(1)培养基：推荐添加了氯化血红蛋白(5 μg/ml)、维生素K_1(1 μg/ml)及溶解马血(5%)的布氏肉汤培养基。微量稀释板可以新鲜配制而后冷冻，或购买商品化的冷冻板或冻干板。商业化稀释板的储存应遵循制造商的建议，而自制稀释板可在密封的塑料袋中，−70℃下最多保存6个月。储存时间超过6个月是否可用取决于稀释板中加入的抗菌药物，并且需经确认。某些药物(如克拉维酸盐和亚胺培南)比其他药物更不稳

定,并随时间而降解。冷冻药敏板不应储存在−20℃自动除霜冰箱中,某些抗菌药物,如β内酰胺类,反复冻融后降解加速。若要冷冻,应先向微量稀释板加入抗菌药物。抗菌药物应根据CLSI文件M11[4]中所述的方案进行稀释。稀释液可以制备成各种体积(如15~100 ml),具体取决于将稀释液按每孔0.1 ml同时等分到标准96孔板中所用的设备[4]。每孔至少加0.1 ml。由于液体易于蒸发,不建议检测厌氧菌的加入量低于0.1 ml。此外,体积小可能扩大接种效应。

(2)接种物准备:接种物的准备与琼脂稀释法相似。取布氏血琼脂平板上经过24~48 h培养后的菌落,重悬于布氏肉汤或其他浅色肉汤中制备0.5麦氏浊度的接种物。快速生长的厌氧菌(如脆弱拟杆菌)可以使用24 h的生长菌落。但是,大多数其他厌氧菌需要48 h才能充分生长。也可通过挑取数个菌落至富含巯基乙酸盐或其他支持待测菌生长的肉汤中孵育6~24 h,达到预期浊度。孵育时间取决于起始接种菌量和待测菌生长速度。然后将该悬浮液稀释至0.5 McFarland标准浊度(约1.5×10^8 CFU/ml)。微生物的终浓度为$(1\sim2)\times10^6$ CFU/ml(10^5 CFU/孔)。商业针型接种器可每孔接种10 μg或5 μg(译者注:原文是μg,应该为μl),移液器可以加入更大体积。因此,稀释需要考虑接种方法的接种量。使用商业稀释板时,应遵循制造商的说明书。

(3)接种过程:冷冻的药敏板使用前应置室温解冻,药敏板解冻可能需要大于60 min。药敏板解冻后,必须立即接种并孵育,在从冰箱取出后4h内完成全部操作。可使用一次性的手持96针接种器、机械分配器或多通道移液器,这取决于接种物是如何制备的。在菌悬液配制后15 min内完成接种。若平板中包含甲硝唑则应将稀释板进行预还原,因为甲硝唑的活性依赖于一个需要还原环境的活化中间体。若甲硝唑未经过预还原,则快速生长或非苛养菌株可能出现假耐药。

(4)孵育条件:稀释药敏板应置于厌氧环境(36±1)℃孵育46~48 h,可以将接种后的药敏板放置在厌氧室中,也可以放在与厌氧瓶相连的大型厌氧罐或带有厌氧气体发生器的厌氧袋中。叠放不应超过4个,以保证孵育温度和气体交换的均一性。此外,药敏板不可用胶带密封,因为这样会减少气体扩散至培养基,导致细菌生长不良或对甲硝唑假耐药。药敏板若未放置到湿润环境中孵育,可能蒸发。如果在不加湿的厌氧环境中培养,使用穿孔胶带或将药敏板放置在塑料袋中,袋口半开以便气体交换,可以最大限度地减少蒸发。

(5)质量控制:微量肉汤稀释法的质控程序与琼脂稀释法相似[4]。CLSI文件M100列出了厌氧质控菌和相关的MIC值[7]。应该进行质控以证明该培养基可以支持待测菌生长,并且在运输或储存过程中抗菌药物未变质。质控应该是每次检测的一部分。

微量肉汤稀释法至少应选择两个质控菌株。所选质控菌株的预期MIC范围应在待测抗菌药物浓度范围内。在选择要检测的质控菌株时,选择浓度范围内的MIC值比选择与待测菌种属接近的质控菌株更为重要。迟缓埃格菌ATCC 43055已显示出MIC变异性,因此,尚未确定该质控菌株对几种抗菌药物的MIC范围[4]。

质控应包含一个不含抗菌药物孔(生长对照孔)和一个无菌肉汤孔(无菌检测)。该生长对照孔也可以用作阴性对照孔,用于与接种孔中细菌生长情况的目测比较。也可以孵育未接种菌液的药敏板进行无菌检测。

建议定期进行菌落计数和接种物纯度检查。应该至少每季度进行一次菌落计数,以确保熟练地准备接种物。如果不经常进行厌氧菌药敏试验,则每次检测都要设置菌落计数。菌落计数时,先从生长对照孔中取出10 μl,加入10 ml生理盐水(1∶100)中稀释(译者注:原文括号中的1∶100有误,应该是1∶1000),再从稀释液中取0.1 ml铺种于非选择性厌氧血琼脂平板进行厌氧培养。100~200个菌落生长表明接种量为$(1\sim2)\times10^6$ CFU/ml。可以将生长对照孔少量接种于血琼脂平板的一个象限上,需氧培养以检测需氧菌污染,并接种于厌氧血琼脂平板上,进行厌氧培养。

(6)结果解释:孵育46~48 h后,MIC的确定可从板底利用反射光通过放大镜观察。与琼脂稀释法相同,MIC指的是细菌生长的减少为最高的抗菌药物浓度。生长减少可表现为底部微弱生长或拖尾。若不含抗菌药物的阳性对照孔内细菌生长不良,则结果不可判读。各种生长特点及其判读可参见CLSIM11图片[4]。

(二)商品化检测方法

1. MIC梯度扩散法 梯度扩散法是一种简

单的方法，易于在常规临床微生物学实验室使用。与琼脂稀释法或微量肉汤稀释法相比，梯度扩散法更常用于厌氧菌药敏试验[3,9]。自1994年推出E-test(bioMérieux)以来，多家制造商已生产类似的梯度扩散法产品。目前，E-test和Liofilchem MIC试纸是仅有的FDA批准的适合厌氧菌的梯度扩散试纸条，但并非所有由这些公司生产的抗菌试纸条都经批准应用于厌氧菌药敏。虽然M. I. C. Evaluator(Oxoid，Thermo Fisher)产品市场有售，但是FDA并未批准其用于厌氧菌检测。

梯度扩散法采用薄塑料或试纸条，具体材料因制造商而异。这些塑料或试纸条一侧浸润有浓度梯度增加的抗菌药物，另一侧印刷刻度。通常用拭子将1.0麦氏浊度的菌悬液涂布于添加了氯化血红蛋白和维生素 K_1 的预还原布氏平板。MIC值为抑菌圈椭圆下端与试纸条相交处试纸条上的相应数字。孵育24～48 h后读取结果。详细信息，请参见制造商的产品说明书。琼脂平板上的药敏试条应分开摆放，避免抑菌圈重叠，抑菌圈重叠使检测结果难以判读。一个琼脂板上可以贴多个药敏试条，这种方法可以根据实验室的需要灵活选择要检测的试纸条。对于质控，制造商的产品包装说明中描述了详细信息。至少应检测一个质控菌株以确保产品功能正常。

每个梯度试纸条售价2～6.5美元，具体价格取决于抗菌药物的种类和制造商。根据定价，使用这种方法检测多种抗菌药物可能变得昂贵。表77-2列出了此方法的优缺点。

梯度扩散法与琼脂稀释法性能比较显示，两种方法在许多种厌氧菌对多种抗菌药物的分类上高度一致[10-14]。一项研究检测了涵盖12种属的102株临床分离厌氧菌，用以评估M. I. C. Evaluator与E试验(E-test)和琼脂稀释法性能[15]。尽管E-test和M. I. C. Evaluator之间的基本和分类一致性>90%，但M. I. C. Evaluator和E-test的分类一致性分别为83%～97%和82%～92%。拟杆菌属、副拟杆菌属和梭菌属对甲硝唑和青霉素错误率较高，分别为13%～14%和8%～9%。其他研究也表明，如果不能充分维持厌氧状态，梯度扩散法可能高估甲硝唑的耐药性[16]。但是，使用前将药敏板置厌氧环境中过夜预还原，可以减少假耐药。在琼脂梯度扩散试验中，厌氧菌质控具有2个功能：①确保抗菌药物试纸条浓度正确；②验证孵育过程中维持厌氧状态。

2. 微量肉汤稀释板 干燥Sensititre厌氧板(ANO2B，Sensititre MIC厌氧板，Thermo Fisher Scientific，Cleveland，OH)是目前唯一市售微量肉汤稀释法厌氧菌药敏试验板。它包含15种抗菌药物，标注为仅用于研究(https://www.thermofisher.com)。只有当药敏板上每一种抗菌药物均获批用于厌氧菌感染治疗时，该药敏板才可获得FDA批准。当前，尚无任何获得FDA批准的商品化产品。根据临床实验室检测需求，Thermo Fisher Scientific还提供冻干定制稀释板。但是，尚缺乏对这些市售厌氧菌药敏试验板的性能评估的研究。Dowzicky等[17]检测47株革兰阳性和革兰阴性厌氧菌(其中主要为革兰阴性厌氧菌)，比较了Sensititre板与琼脂稀释法美罗培南的敏感性，2种方法之间的总体一致性为93%(±一个2倍稀释梯度)。值得注意的是，CLSI不建议微量肉汤稀释法用于除拟杆菌属和副拟杆菌属以外的其他厌氧菌药物敏感性试验[4]，并且Hastey等[8]发表的文献表明，对于某些厌氧菌(如艰难拟梭菌)，琼脂和微量肉汤稀释法之间的相关性较差。

3. β内酰胺酶试验 显色头孢菌素类可用于检测厌氧菌产生的β内酰胺酶。拟杆菌属因产该酶，被认为对氨苄西林、阿莫西林和青霉素耐药，不需要进行显色头孢菌素检测。其他革兰阴性厌氧菌，如普雷沃菌属、卟啉单胞菌属、梭菌属、梭杆菌属，或革兰阳性厌氧菌需要进行β内酰胺酶检测。可以从BD Diagnostics，Hardy Diagnostics和Thermo Fisher Scientific等许多制造商处购买显色头孢菌素纸片，但是并非所有显色纸片均已获得FDA批准用于厌氧菌检测。当产生β内酰胺酶时，该酶水解β内酰胺环，导致纸片颜色从黄色变为红色。对于大多数厌氧菌，反应通常在5～10 min内发生。但是，在某些梭杆菌中，酶促反应可能要慢很多[18]。因此，建议阴性结果在变色反应达30 min后再报告。值得注意的是，对β内酰胺类药物的耐药性可以通过产生β内酰胺酶以外的其他机制介导。因此，β内酰胺酶检测阴性，不能确定氨苄西林、阿莫西林和青霉素的敏感性。已发现β内酰胺类耐药的其他机制，例如，一些狄氏副拟杆菌(*Parabacteroides distasonis*)中青霉

素结合蛋白的改变[19]。如果试验呈阳性，则无论MIC结果如何，都应报告该菌对青霉素、阿莫西林和氨苄西林耐药。如果β内酰胺酶阳性，但青霉素或氨苄西林药敏结果为敏感或中介，实验室可屏蔽MIC结果，将青霉素或氨苄西林报告为耐药。或者报告为耐药，将MIC测定值更改为≥2 μg/ml(CLSI耐药性折点)。

4. 纸片扩散法 由于结果不准确，而且纸片扩散法与琼脂稀释法之间缺乏相关性，CLSI不建议将纸片扩散法用于厌氧菌药敏试验[4]。在最近发表的论文中，作者重新评估了拟杆菌属和副拟杆菌属使用纸片扩散法对一些抗菌药物的敏感性[20]。他们的研究表明足够的重复性，重复测量88.5%的差异为0～3 mm。某些抗菌药物(如甲硝唑、亚胺培南、莫西沙星和替加环素)纸片扩散法与微量肉汤稀释法的结果解释类别一致。但是，其他抗菌药物，包括头孢西丁和β内酰胺类复合制剂，抑菌圈大小与中介和耐药解释类别重叠。其他人采用不同于CLSI或EUCAST描述的纸片扩散法培养基获得可重复的结果，例如纸片琼脂培养基[21]，将脑心浸液、预还原的肉汤添加到融化的琼脂中[22]。Johnson等[23]研究表明，氧毒性在改变菌悬液中活菌数量方面发挥作用。此因素可能导致纸片扩散法检测厌氧菌缺乏重复性。在完成更多工作以前，不建议实验室常规开展纸片扩散法。

厌氧菌对万古霉素(5 μg)、卡那霉素(1000 μg)和黏菌素(10 μg)纸片法的耐药情况可以作为推测厌氧菌鉴定算法的一部分[24-25]。然而，这些纸片的使用目的不是用于治疗目的抗菌药物敏感性的检测。

二、厌氧菌耐药谱

(一)革兰阴性杆菌

拟杆菌 拟杆菌属是临床微生物学实验室中最常见的厌氧菌之一，也是最具毒性的。它们是血液、脓液(尤其是腹腔内来源)和骨损伤中最常分离到的厌氧菌[19]。尽管从脓液中分离出来的拟杆菌通常混合其他厌氧菌和需氧菌，但拟杆菌和副拟杆菌通常是从血液中分离的唯一病原菌，并且是菌血症病例中分离的最常见的厌氧菌[26]。拟杆菌属可能表现为对用于治疗厌氧菌感染的各类抗菌药物耐药。碳青霉烯类药物的敏感性虽然很高，但在某些地区正在下降[27]。已有研究发现了甲硝唑耐药株。拟杆菌属对常用抗菌药物敏感性降低令人担忧。因此，应考虑对从临床感染患者分离的拟杆菌属细菌进行抗菌药物敏感性试验。

过去，脆弱拟杆菌群的组成包括脆弱拟杆菌、多形拟杆菌、卵形拟杆菌和普通拟杆菌等。脆弱拟杆菌群最初认为是抗胆汁的拟杆菌属，但是该群成员在文献中并未得到很好的描述。其他拟杆菌属细菌，例如化脓拟杆菌，传统上不包括在脆弱拟杆菌群中。同样，狄氏副拟杆菌(*P. distasonis*)，以前称为狄氏拟杆菌(*Bacteroides distasonis*)，过去也认为属于脆弱拟杆菌群，但现在有了不同的属名。此外，脆弱拟杆菌群在分类学上尚未正式确认[28]。一些作者将脆弱拟杆菌群称为"前脆弱拟杆菌群"。在已发表的文献中，经常有作者报道脆弱拟杆菌群的敏感性情况，但未指定其中所包含的菌种。

在拟杆菌属中，脆弱拟杆菌通常是敏感性最高的细菌[3-29]。对2010至2012年从美国7个医学中心收集的779株拟杆菌属细菌进行琼脂稀释法药敏试验，结果表明各菌种之间敏感性存在差异[30]。与其他拟杆菌属细菌相比，普通拟杆菌和狄氏拟杆菌对哌拉西林-他唑巴坦的耐药率更高(分别为2.3%和2.9%)。普通拟杆菌和粪拟杆菌对莫西沙星耐药率较高，分别为79%和70%，而脆弱拟杆菌对莫西沙星耐药率仅为19%。普通拟杆菌对美罗培南的耐药率最高(耐药率分别为2.3%和1/43)。多形拟杆菌和卵形拟杆菌对抗菌药物表现出更高的MIC值[3,31]。鉴于拟杆菌和副拟杆菌各菌种之间药物敏感性存在差异，故临床分离菌应鉴定到菌种水平，以指导临床上抗菌药物的经验性治疗。

β内酰胺类抗菌药物对拟杆菌属具有一定的活性。大部分拟杆菌属细菌对青霉素和氨苄西林天然耐药，主要原因是其产β内酰胺酶。同时，它们也会表达青霉素结合蛋白而对青霉素和氨苄西林耐药[4,32]。但是，β内酰胺类复合制剂哌拉西林-他唑巴坦和氨苄西林-舒巴坦通常对大多数拟杆菌属细菌具有活性[7]。采用CLSI折点对E-test数据进行分析的最新全球研究表明，β内酰胺类复合制剂的敏感性大于85%，而在普通拟杆菌

和狄氏副拟杆菌中敏感性较低[33]。哌拉西林-他唑巴坦通常比氨苄西林-舒巴坦或阿莫西林-克拉维酸对拟杆菌的活性更高。对来自欧洲13个国家分离的824株拟杆菌属和副拟杆菌属细菌进行琼脂稀释法药敏试验研究表明，应用EUCAST折点时，哌拉西林-他唑巴坦的活性高于阿莫西林-克拉维酸盐（耐药率分别为3.1%和10.4%）[34]。基于CLSI方法检测全球范围内收集的1580株分离菌，结果表明，拟杆菌对哌拉西林-他唑巴坦的耐药性显著增长，从2007－2009年的2%到2010－2012年的7%[35]。在此期间，对氨苄西林-舒巴坦的耐药性也显著增加，从2007－2009年的4%到2010－2012年的6%。基于CLSIM100的厌氧菌药敏谱（antibiogram）报告显示，基于2018年CLSI更新折点，拟杆菌属和副拟杆菌属细菌对哌拉西林-他唑巴坦的耐药率为0～1%，而对氨苄西林-舒巴坦的耐药性范围从2%（脆弱拟杆菌）到19%（狄氏副拟杆菌）[7]。

头孢西丁和头孢替坦通常对拟杆菌属和副拟杆菌属细菌具有活性，大型监测调查显示其敏感率平均为80%～85%[30,34,36-37]。加拿大一项微量肉汤稀释法药物敏感性监测研究报告称，在387株拟杆菌属和副拟杆菌属细菌中，头孢西丁敏感率平均为85%[36]。日本一项多中心的微量肉汤稀释法研究报告头孢西丁敏感率为80%～88%[37]。Snydman等[30]在美国进行的一项研究结果显示，2010至2012年来自7个医疗中心的779株拟杆菌属和副拟杆菌属细菌，根据CLSI折点，头孢西丁MIC值≥64 μg/ml的菌株占7.9%。选定美国医院分离菌的CLSI数据在M100中以CLSI药敏谱（antibiogram）形式发布报告显示，所测分离菌敏感性均略低，为70%（$n=1572$），从脆弱拟杆菌的敏感性100%敏感到多形拟杆菌的13%敏感[7]。头孢西丁耐药性在世界某些地区呈稳定或下降趋势[35]，但在其他地区呈上升趋势。Nagy等[34]报道，从欧洲国家收集的分离株对头孢西丁的耐药性随时间推移而增加。头孢西丁耐药性从1998－1999年的3%增加到2008－2009年的17%[38]。广谱头孢菌素如头孢噻肟对拟杆菌的活性较弱，敏感性约为20%[37]。

青霉素和头孢菌素耐药性主要由*cepA*或*cfxA*介导[39]。*cepA*（位于染色体上）编码一种头孢菌素酶，该酶导致头孢菌素和氨基青霉素耐药，但对β内酰胺类复合制剂无耐药性。膜孔蛋白缺失还可能导致β内酰胺类MIC值升高，包括对β内酰胺类复合制剂耐药[40]。*cfxA*基因编码广谱内酰胺酶，介导头孢西丁及其他几种β内酰胺类药物耐药[41]。

碳青霉烯类对拟杆菌有很高的活性。大多数研究报告敏感率≥95%，通常远高于99%[30,42]。2008－2009年，美国拟杆菌分离株对多立培南、厄他培南、亚胺培南或美罗培南的耐药率范围为1.1%～2.5%[2]。基于CLSI药敏谱（antibiogram）数据显示，碳青霉烯类耐药性正在上升，厄他培南、亚胺培南和美罗培南耐药率从2007－2009年的0上升到2010－2012年的1%[35]。Seifert等[43]报道，2007年德国一项多中心研究收集腹腔内感染分离菌，厄他培南和美罗培南对拟杆菌属各菌种敏感性≥90%（根据EUCAST碳青霉烯类折点）。值得注意的是，EUCAST碳青霉烯类敏感折点比CLSI低1～2个浓度梯度，这可能导致敏感率比使用CLSI折点的研究低。拟杆菌对碳青霉烯类耐药率最高的报道之一是中国台湾北部分离株的琼脂稀释法研究，拟杆菌对厄他培南耐药率为13.5%[44]。

拟杆菌对碳青霉烯类的耐药性主要来自染色体，并且与*cfiA*耐药基因的存在有关，*cfiA*基因编码锌金属β内酰胺酶导致β内酰胺类和β内酰胺类复合制剂耐药[45]。然而，*cfiA*的存在本身不足以表达典型的碳青霉烯类耐药表型。拟杆菌中*cfiA*是沉默的[46]，只有插入序列才将其激活。在大多数（但不是全部）情况下，上调与*cfiA*相关的插入序列会导致碳青霉烯类耐药。Sóki等通过E-test或琼脂稀释试验（EUCAST标准为4 mg/L中介，CLSI标准为≤4 μg/ml敏感）研究了22株分离自欧洲的拟杆菌和副拟杆菌对亚胺培南（MIC值≥4 μg/ml）的耐药机制[46]。作者发现亚胺培南MIC值为4 μg/ml的3/12分离株含有*cfiA*基因，3株中只有一株包含一个可能激活*cfiA*基因的插入序列。另一方面，MIC值为8～32 μg/ml的7/10分离株含有*cfiA*基因，7株菌中有3株不包含插入序列。这3个菌株的MIC分别为8、32和>32 μg/ml。因此，通过除插入序列以外的不确定机制激活*cfiA*基因可能导致亚胺培南耐药。Nakamura和他的同事报道了一例死亡的脓毒血症病例，该病例是由于腹腔感染多重

耐药的脆弱拟杆菌，并且在 *cfiA* 基因上游具有插入序列元件，导致微量肉汤稀释法检测美罗培南和亚胺培南的 MIC 为＞8 μg/ml[47]。研究人员通过使用碳青霉烯酶灭活方法确认了该分离菌产生碳青霉烯酶，并通过使用碳青霉烯类 EDTA E-test 试纸（MBL IP/IPI，bioMérieux）证实了脆弱拟杆菌产生金属 β 内酰胺酶。尽管尚缺乏对该方法用于厌氧菌检测的研究，但诸如此类的分子和表型研究可能会在将来增加我们对耐药机制的了解。

大多数研究显示，继氨苄西林和青霉素之后，克林霉素对拟杆菌和副拟杆菌的活性最低[34]。美国一项对 2010－2012 年拟杆菌和副拟杆菌分离株进行的调查显示，在 779 株拟杆菌属中，33.2%拟杆菌对克林霉素 MIC≥8 μg/ml[30]。CLSI 发表的药敏谱（antibiogram）同样显示出对克林霉素的高耐药性，从脆弱拟杆菌的 22%到卵形拟杆菌的 51%[7]。美国以外的最新监测报告也显示克林霉素的高耐药率：Nagy 等[34]于 2008－2009 年在欧洲多中心研究中收集并经琼脂稀释法检测，分离株耐药率达 28.5%～60%，2011－2013 年在荷兰收集并经 E-test 检测，分离株耐药率为 15%～40%[31]，2014 年在日本收集并经微量肉汤稀释法检测，分离株非敏感率（中介和耐药）为 36%～53%[37]。克林霉素耐药性由位于可转移质粒上的 *erm* 介导[48]。

莫西沙星敏感性因菌种而异，2005－2007 年美国中心约有 31%的脆弱拟杆菌表现为耐药[42]。在同一作者的另一项美国研究中，2006－2009 年收集的菌株中，脆弱拟杆菌对莫西沙星耐药率上升至 40%，在较不常见的拟杆菌如粪拟杆菌和埃格拟杆菌中则上升至 83%[2]。其他非美国研究也显示出不同程度的耐药性，在阿根廷的全国性研究中采用琼脂稀释法检测拟杆菌的耐药性为 7%～15%[29]，加拿大 CANWARD 监测中通过肉汤微稀释法检测拟杆菌的耐药性达 34%[36]。一项欧洲多中心监测研究表明，拟杆菌属对莫西沙星具有获得性耐药，莫西沙星敏感性从 2003 年的 91%下降至 2009 年的 86.4%[34]。莫西沙星耐药性由 *gyrA* 突变和外排泵介导。

甲硝唑耐药的拟杆菌很少见但已有报道。研究中的总体耐药率通常远低于 2%，加拿大 CANWARD 研究报告为 0.3%（n=387 株拟杆菌属），在加拿大安大略省的一项研究中耐药率为 1.2%（n=170 株脆弱拟杆菌）；在日本的一项监测研究中，非敏感率为 0.9%（包括中介和耐药）（n=110 株，不含脆弱拟杆菌的拟杆菌属）。最后，美国一项基于 CLSI 的研究（n=1503 株脆弱拟杆菌）中，耐药率为 2%[35-37,49]。甲硝唑耐药性与 *nimA-H*（硝基咪唑还原酶）基因有关，该基因可能位于质粒或染色体上。*nimA-H* 基因的表达导致甲硝唑的硝酸盐部分还原为氨基衍生物，从而降低了抗菌药物的有效性。但是，仅存在 *nim* 不足以表达甲硝唑耐药性表型，因为 *nim* 也可以在对甲硝唑敏感的菌株中发现。一项对 206 株脆弱拟杆菌的研究显示，24%检出 *nim*，且 *nim* 阳性分离株中甲硝唑 MIC 范围为 1.5（敏感）～256（耐药）μg/ml[50]。尽管许多 *nim* 阳性拟杆菌属细菌不表现为耐药，但可以通过亚抑制浓度的抗菌药物诱导表达出现甲硝唑高 MIC 值[51]。不携带 *nimA-H* 基因的甲硝唑耐药菌株已有报道，这些菌株中导致甲硝唑耐药的机制尚有待探究[46,52]。

多重耐药拟杆菌属细菌报道越来越多。2011 年，Sherwood 及其同事发表了一例关于战斗中爆炸装置造成的腿部伤口中分离出多重耐药脆弱拟杆菌的病例报告[45]。该分离株对青霉素、克林霉素、甲硝唑、头孢西丁、美罗培南、亚胺培南、哌拉西林-他唑巴坦和替加环素耐药，但对莫西沙星敏感，MIC＜0.5 μg/ml，对利奈唑胺 MIC＜2 μ/ml。该分离株质粒携带 *nimE* 基因，导致甲硝唑耐药。该患者成功接受莫西沙星和利奈唑胺联合治疗。另一例从术后腹腔内脓肿和脓胸患者分离出多重耐药多形拟杆菌的报告强调，通过使用全基因组测序证明该分离株携带对甲硝唑、β 内酰胺类药物、四环素、克林霉素、氯霉素的耐药基因，以及导致多种抗菌药物耐药的外排基因[53]。耐药-结节-分裂家族（resistance-nodulation-division family）的外排泵可能是导致多重耐药的主要原因[19]。这些报告强调了对具有临床意义的拟杆菌分离株进行药敏试验的重要性，以及更好地研究表型背后耐药机制的重要性。

（二）拟杆菌属以外的革兰阴性杆菌

革兰阴性厌氧杆菌除拟杆菌属外包括普雷沃菌属（*Prevotella*）、卟啉单胞菌属（*Porphy-*

romonas)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)、沃兹沃思嗜胆菌(*Bilophila wadsworthia*)、纤细弯曲菌(*Campylobacter gracilis*)和沃兹沃思萨特菌(*Sutterella wadsworthensis*)等。这些厌氧革兰阴性菌比拟杆菌对用于治疗厌氧菌感染的抗菌药物更敏感。普雷沃菌属在口腔中占主导地位，可能与人咬伤和牙周感染有关。卟啉单胞菌也是常见的口腔微生物，可能导致严重的口腔和牙周疾病。卟啉单胞菌也可以从腹腔内和女性生殖道中分离出来。梭杆菌属可能导致脓毒症并伴有脓肿。两种最常分离的梭杆菌包括具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)和坏死梭杆菌(*Fusobacterium necrophorum*)。尽管其他厌氧菌或需氧菌也可能引起Lemierre综合征(例如，颈内静脉脓性血栓性静脉炎)，但以坏死梭杆菌引起的最常见。沃兹沃思嗜胆菌是引起腹腔内多种微生物感染的重要原因。

普雷沃菌比卟啉单胞菌对大多数抗厌氧菌药物更不敏感。在2007－2009年分离的173株普雷沃菌中，青霉素和(或)氨苄西林耐药率约为50%[35]。新西兰于1999－2003年使用琼脂稀释法检测45株普雷沃菌，耐药率为82%[54]。CLSI总结了克林霉素和莫西沙星对普雷沃菌属的敏感率分别为69%和66%[7]。加拿大安大略省的一项监测研究用E-test检测100株普雷沃菌，克林霉素耐药率为12%[49]。台湾在2000－2007年间对1075株普雷沃菌进行研究，其中对青霉素的敏感率为20%～35%，对氨苄西林-舒巴坦的敏感率为90%～100%[27]。总体而言，普雷沃菌对氨苄西林-舒巴坦、哌拉西林-他唑巴坦、亚胺培南、美罗培南和甲硝唑的敏感率≥97%。Veloo及其同事报道了利用E-test检测了荷兰分离的123株普雷沃菌，发现甲硝唑的耐药率为4%[31]。但是，这项研究采用了EUCAST对甲硝唑的结果解释(敏感：≤4 mg/L；耐药：>4 mg/L)，这与CLSI的解释不同(敏感：≤8 μg/ml；中介：16 μg/ml；耐药：≥32 μg/ml)。该研究中MIC_{90}为1.5 mg/L(范围：0.016～4.000 mg/L)。虽然头孢菌素酶已在普雷沃菌属中有报道，但是除拟杆菌以外的大多数革兰阴性厌氧杆菌均产青霉素酶[55-56]。

具有临床意义的大规模对卟啉单胞菌属耐药监测的研究很少见，因为大多数分离株与牙髓或牙周疾病有关，通常不进行药敏试验。E-test检测45株卟啉单胞菌对青霉素和头孢西丁的敏感率分别为94%和97%。所有分离株均对氨苄西林-舒巴坦、亚胺培南、克林霉素和甲硝唑敏感[57]。卟啉单胞菌几乎对碳青霉烯类药物和甲硝唑都敏感。但是，一项哥伦比亚研究，采用E-test法检测牙周病患者牙周龈下袋中分离的51株牙龈卟啉单胞菌，研究结果显示阿莫西林、克林霉素和甲硝唑的耐药率分别高达25%、24%和22%[58]。来自世界其他地区的类似研究并未表现出这种耐药性。在荷兰，从顽固性或慢性牙周炎患者龈下斑中分离的50株牙龈卟啉单胞菌对阿莫西林、克林霉素和甲硝唑敏感[59]。哥伦比亚最近用M.I.C. Evaluator(Oxoid)检测慢性牙周炎患者牙周袋中分离的30株牙龈卟啉单胞菌，甲硝唑敏感率为100%，四环素敏感率为90%[60]。

青霉素耐药的梭杆菌属比较少见。在中国台湾地区的一项调查中，只有4/36(11%)梭状杆菌株头孢噻吩纸片检测结果为β内酰胺酶阳性[27]。琼脂稀释法检测结果显示，所有梭杆菌属对甲硝唑、哌拉西林-他唑巴坦和厄他培南敏感，而大约20%的分离株对莫西沙星耐药。对梭杆菌从2000－2007年的耐药趋势研究表明，青霉素、克林霉素和氨苄西林-舒巴坦敏感性显著降低[27]。日本对16株梭杆菌研究显示，所测药物中，莫西沙星敏感率最低为67%[37]。CLSI在2007－2009年针对44株梭杆菌药敏谱(antibiogram)数据报告，莫西沙星敏感性为95%，其他所测药物的敏感性均为100%[35]。E-test法检测19株梭杆菌属细菌并用EUCAST折点判断其对阿莫西林和阿莫西林-克拉维酸的耐药率分别为16%和5%，没有显示出对克林霉素或甲硝唑的耐药性[31]。梭杆菌对克林霉素和头孢西丁的耐药率通常低于10%[49]。其他梭杆菌的耐药性不能一概而论，敏感性可能因菌种而异。死亡梭杆菌可能对头孢菌素耐药，但超过90%的具核梭杆菌和坏死梭杆菌对头孢菌素和头孢霉素敏感[61]。大环内酯和利福平耐药性在具核梭杆菌和死亡梭杆菌中几乎普遍存在[3]。CLSI指出猫狗梭杆菌对喹诺酮类和氨基糖苷类天然耐药[7]。

沃兹沃思嗜胆菌通常对青霉素耐药，但对其他抗菌药物高度敏感，如阿莫西林-克拉维酸、克林霉素、碳青霉烯类和甲硝唑[31,57]。沃兹沃思萨特菌可能对克林霉素、哌拉西林和甲硝唑耐药[62]。

纤细弯曲菌（以前的拟杆菌）对大多数抗菌药物敏感，包括β内酰胺类复合制剂、头孢西丁和克林霉素[63]。

(三)革兰阳性芽胞杆菌

1. 艰难拟梭菌(*Clostridioides difficile*) 艰难梭菌(*Clostridium difficile*)最近重命名为艰难拟梭菌(*Clostridioides difficile*)[64]。艰难拟梭菌是目前美国医院中最常见的引起卫生保健相关感染的病原菌，也是门诊患者腹泻病的重要病原菌。过去，治疗艰难拟梭菌感染(*C. difficile* infection，CDI)最常用的抗菌药物是甲硝唑或万古霉素。美国传染病学会(Infectious Diseases Society of America)和美国卫生保健流行病学协会(Society for Health-care Epidemiology of America)最近更新了成人和儿童CDI临床实践指南，建议使用万古霉素或非达霉素而不是甲硝唑治疗最初发作的CDI[65]。此外，非达霉素现在也认为是CDI首次复发的治疗选择。尽管通常以培养以外的方法诊断CDI，但仍可能要求临床实验室从粪便标本中培养艰难拟梭菌，以检测包括非达霉素在内的抗菌药物的敏感性。但是值得注意的是，艰难拟梭菌现有临床折点是基于全身性感染的，而全身性感染治疗是基于全身性而非肠道内药代动力学和药效学。例如，口服给药治疗CDI的万古霉素浓度在肠腔内很高（例如，粪便中高于1000 μg/ml），远高于>2 mg/L的EUCAST MIC折点[66]。另一方面，各种抗菌药物临床折点更适用于肠道外分离的艰难拟梭菌。

甲硝唑和万古霉素在大多数CDI病例中均有效，尽管这些抗菌药物MIC升高已有报道[67]。在世界上大多数地区，艰难拟梭菌对甲硝唑的耐药相对较少，但这一结论取决于使用哪个折点来解释结果[68]。CLSI中厌氧菌，包括艰难拟梭菌，对甲硝唑的折点为：敏感≤8 μg/ml、中介16 μg/ml、耐药≥32 μg/ml。EUCAST已为艰难拟梭菌建立了专门的折点，该折点不同于其他厌氧菌对甲硝唑的折点，并且低于CLSI折点，即：敏感≤2 mg/L、耐药>2 mg/L(www.eucast.org)。美国对2011年和2012年分离的925株艰难拟梭菌检测结果用EUCAST折点分析，甲硝唑耐药率3.6%，而根据CLSI折点，没有菌株归为耐药[69]。

艰难拟梭菌对万古霉素的MIC值升高也已经有报道。由于CLSI尚未设定万古霉素对厌氧菌的临床折点，因此大多数研究都采用了EUCAST万古霉素折点（敏感：≤2 mg/L；耐药：>2 mg/L）。普遍报道万古霉素耐药率低于5%，但更高的耐药率也有报道[70]。美国2011—2012年的一项调查显示，在925株艰难拟梭菌分离株中，有17.9%对万古霉素敏感性降低。万古霉素 MIC_{90} 为4 μg/ml，高于8年前类似研究中的1 μg/ml[69,71]。

EUCAST或CLSI尚无利福平折点，但MICs升高(>16 μg/ml)已有报道。不同地区分离株耐药率在8%～13%范围内[70,72]。非达霉素敏感性降低较罕见，非达霉素早期临床试验中，MIC_{90} 为0.25 μg/ml，最高MIC为1 μg/ml[73]。在临床试验中发现了一株非达霉素MIC为16 μg/ml的艰难拟梭菌，报道称该患者在使用非达霉素治疗时，疾病消退6天后复发[74]。最近对从毒素阳性粪便中分离的925株艰难拟梭菌研究显示，所有分离株都被非达霉素以≤1 μg/ml的浓度抑制生长，MIC_{90} 为0.5 μg/ml[69]。基于2012—2015年发表的30项抗菌药物敏感性研究，艰难拟梭菌对多种抗菌药物耐药，包括克林霉素(8%～100%)、红霉素(13%～100%)和氟喹诺酮类(8%～100%)[68]。艰难拟梭菌对头孢菌素的耐药性几乎普遍存在[3]。在头霉素中，对头孢西丁和头孢替坦耐药常见，在测试菌株中耐药率至少为80%[68]。美国最近对925株艰难拟梭菌的调查显示，莫西沙星耐药率为33.5%，克林霉素耐药率为23.8%，证实了产生二元毒素菌株的耐药率高[69]。美国医学中心针对分离自肠道的艰难拟梭菌CLSI 2013-2016药敏谱(antibiogram)数据显示，青霉素耐药率为37%，克林霉素为38%，莫西沙星为25%[7]。只有4%的分离株对亚胺培南耐药，而对氨苄西林-舒巴坦、哌拉西林-他唑巴坦、美罗培南或甲硝唑则敏感。

比较核糖体分型时观察到药敏率存在差异。在北美，027型对包括利福平、克林霉素和莫西沙星在内的多种药物耐药[72]。另一个高毒力菌株，078型也显示出对环丙沙星、莫西沙星、红霉素和亚胺培南耐药[75]。艰难拟梭菌耐药性对于监测患者治疗，以及与某些核型流行病学相关性非常重要。例如，高毒性艰难拟梭菌027/BI/NAP1菌株的出现与氟喹诺酮类药物的消耗有关[76]。即使临床上并未使用氟喹诺酮类药物治疗CDI，

由于广泛使用这些药物而产生的抗菌药物压力已使这种对氟喹诺酮类耐药的高毒力菌株得以传播。

艰难拟梭菌对抗菌药物的耐药性是多因素造成的，可能由于抗菌药物耐药性靶位的改变、移动遗传元件的获得、代谢途径的变化或生物膜的产生[77]。移动遗传元件在艰难拟梭菌基因组中占很大比例，约 11%[78]。克林霉素和红霉素的耐药是由转座子介导的，转座子与 *ermB* 基因和大环内酯类-林可酰胺-链霉菌素 B 诱导的耐药有关[68]。对 β 内酰胺类药物耐药是由于青霉素结合蛋白和产生 β 内酰胺酶[68]。*cfr* 基因表达导致利奈唑胺耐药，而 *tet*(M)表达导致四环素耐药[79]。甲硝唑和万古霉素的耐药认为是由于靶位改变或生物体代谢途径改变所致[68]。*rpoB* 基因突变与非达霉素和利福平敏感性降低相关[80-81]。

2. 艰难拟梭菌以外的梭状芽胞杆菌 梭状芽胞杆菌通常存在于自然环境中。临床微生物学实验室分离的大多数梭状芽胞杆菌来自血流感染、伤口或腹腔。败毒梭菌(*Clostridium septicum*)和产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)是引起菌血症的 2 种最常见梭菌[82]。与皮肤和软组织感染相关的最常见的梭状芽胞杆菌包括产气荚膜梭菌、败毒梭菌、溶组织梭菌(*Clostridium histolyticum*)和索氏梭菌(*Clostridium sordellii*)。

据报道，产气荚膜梭菌对青霉素和克林霉素高度敏感。然而，随着时间的推移，出现了克林霉素耐药的产气荚膜梭菌。在 2007－2009 年未发现耐药株，但 2010－2012 年耐药率为 7%[35]。最新 CLSI 药敏谱(antibiogram)数据显示，2013－2016 年分离的产气荚膜梭菌对克林霉素耐药率高达 12%[7]。同样在该研究中报道，产气荚膜梭菌对青霉素和莫西沙星耐药率分别为 4%和 9%，而对其他抗菌药物(包括氨苄西林-舒巴坦、哌拉西林-他唑巴坦、亚胺培南、美罗培南和甲硝唑)敏感。加拿大安大略省 Marchand-Austin 及其同事对 67 株产气荚膜梭菌用 Etest 法检测结果显示，克林霉素耐药率为 3.8%，未检出对头孢西丁、美罗培南、甲硝唑、青霉素或哌拉西林-他唑巴坦耐药的菌株[49]。来自加拿大卡尔加里的另一项研究显示，2000 年－2006 年自血液分离的 58 株产气荚膜梭菌对克林霉素耐药率为 14%[82]，对青霉素和甲硝唑均敏感。

大多数梭状芽胞杆菌对碳青霉烯类和 β 内酰胺类复合制剂敏感[83]。同样，对甲硝唑耐药率低，而在大多数调查中发现莫西沙星耐药率平均为 20%[35]。比利时一项对 38 株非艰难拟梭菌梭状芽胞杆菌(包括 17 株产气荚膜梭菌)的 E-test 法药敏试验研究显示，莫西沙星(66%)和青霉素(71%)敏感率最低，甲硝唑(100%)、阿莫西林-克拉维酸(100%)和哌拉西林-他唑巴坦最高(98%)[84]。另一项研究显示，在 20 株梭状芽胞杆菌属细菌中，克林霉素耐药率为 20%(MIC_{90} 为 8 μg/ml)，阿莫西林耐药率为 10%[31]。导致克林霉素耐药的原因是 23SrRNA 亚基的甲基化改变了药物作用位点[55]。

“RIC”群，即多枝梭菌(*Clostridium ramosum*)、无害梭菌(*Clostridium innocuum*)和梭形梭菌(*Clostridium clostridioforme*)，在非艰难拟梭菌梭菌属细菌中耐药率最高。梭形梭菌产 β 内酰胺酶，对几种 β 内酰胺类药物耐药，但万古霉素 MIC 低[85-86]。梭状芽胞杆菌“RIC”群和丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)产生由染色体编码且释放到细胞外的 β 内酰胺酶，以及青霉素结合蛋白导致包括头霉素类和头孢菌素类在内的 β 内酰胺类药物耐药[55]。无害梭菌对头孢西丁和头孢替坦耐药，万古霉素 MIC 值高(8～32 μg/ml)[87]。CLSI 已确定无害梭菌对万古霉素天然耐药[7]。幸运的是，无害梭菌对甲硝唑敏感。最后，多枝梭菌对万古霉素也呈高 MIC 值。

(四)革兰阳性无芽胞杆菌

最需要做药敏试验的革兰阳性无芽胞厌氧菌包括放线菌属、斯氏放线线菌、双歧杆菌属、皮肤杆菌属、迟缓埃格菌、真杆菌属和厌氧乳杆菌属。这些细菌是口腔、胃肠道、泌尿生殖道、皮肤和黏膜的正常菌群。与这些细菌相关的头颈部感染常源于口腔，并且为需氧菌和厌氧菌混合感染[88]。腹膜内和泌尿生殖系统感染可能由于黏膜屏障破损，通常是多种微生物感染。以下各节介绍上述细菌的典型药敏检测方法和常见耐药机制。动弯杆菌属、小弯菌属和陌生菌属属于革兰阳性无芽胞杆菌，但在临床微生物学实验室中很少检出，不作进一步讨论。

1. 放线菌属 放线菌通常在口腔定植，引起的感染通常与口腔卫生不良有关，表现为颈颜面

损伤或皮肤软组织脓肿。腹腔盆腔放线菌病和胸腔放线菌病分别与使用宫内节育器和吸入口咽分泌物有关。青霉素、阿莫西林和头孢曲松对放线菌的 MIC 值通常在敏感范围[89-90]。但是，当伴有其他产β内酰胺酶细菌（如葡萄球菌或革兰阴性菌）感染时，很少单独使用青霉素或头孢菌素治疗与放线菌有关的混合感染。临床医生可能考虑将碳青霉烯类药物用于这种感染，并且放线菌属碳青霉烯类的 MIC 值通常在敏感范围内[90]。克林霉素是皮肤和软组织感染经验性治疗的常用药物，但对放线菌属的活性因菌种而异[91]。加拿大安大略省采用 E-test 法对临床分离的 376 株放线菌进行的大规模耐药性监测显示，放线菌属细菌对克林霉素的耐药率为 17.8%（MIC_{90} 0.5 μg/ml）[49]。最近的一项研究采用琼脂稀释法检测临床分离的 8 个菌种的 80 多株放线菌，结果显示克林霉素 MIC_{90} 值因菌种而异[89]。克林霉素对苏黎世放线菌 MIC_{90} 为 0.063 μg/ml（$n=18$），而雷丁放线菌 MIC_{90} 为 64 μg/ml（$n=11$）。大环内酯类折点不适用于厌氧菌，但是有报道显示放线菌属细菌对红霉素的 MIC 值在各菌种间差异明显，范围从＜0.063 μg/ml 到＞128 μg/ml[89]。尽管目前缺乏临床折点，但是环丙沙星和左氧氟沙星通常对放线菌属细菌表现为高 MIC 值[89]。在一项研究中，用琼脂稀释法检测 14 株放线菌属细菌，环丙沙星 MIC_{50} 和 MIC_{90} 分别为 8 μg/ml 和 64 μg/ml[92]，莫西沙星 MIC 低于环丙沙星和左氧氟沙星 MIC[93]。在丹麦的一项研究中用 E-test 法检测 33 株放线菌属细菌，只有 15% 的菌株莫西沙星 MIC≥8 μg/ml（CLSI 耐药折点为≥8 μg/ml），该研究同时评估了典型菌株和临床菌株[90]。已经报道了万古霉素（MIC_{90} 0.5μg/ml）和利奈唑胺（MIC_{90} 0.5～1.0 μg/ml，取决于菌种）对放线菌属细菌的 MIC 值低。革兰阳性无芽胞厌氧杆菌对这 2 种药物均无 CLSI 或 EUCAST 折点。放线菌属细菌包括欧洲放线菌、纽氏放线菌、苏黎世放线菌和泌尿生殖道放线菌[89,91]倾向于对β内酰胺类和克林霉素表现出更高的耐药性。放线菌属所有细菌对甲硝唑天然耐药，琼脂稀释法 MIC 范围为 32～128 μg/ml（CLSI 耐药折点为≥32 μg/ml）[91]。

2. 斯氏放线线菌（*Actinotignum schaalii*） 斯氏放线线菌［以前称为斯氏放线棒菌（*Actinobaculum schaalii*）］逐渐认为是老年人和尿道异常患者尿道感染的病因。该菌也可能引起菌血症等严重感染。阿莫西林、头孢曲松、莫西沙星和万古霉素对斯氏放线线菌的 MIC 值低，但斯氏放线线菌对甲硝唑耐药率高[94]。E-test 法检测临床分离的 48 株斯氏放线线菌中，阿莫西林 MIC_{90} 为 0.25 μg/ml（EUCAST 敏感折点，≤4 mg/L，尚无 CLSI 折点），头孢曲松 MIC_{90} 为 0.12 μg/ml（CLSI 敏感折点，≤16 μg/ml）和万古霉素 MIC_{90} 为 0.25 μg/ml[94]。但是，斯氏放线线菌对克林霉素的敏感性不同，最近一项研究报道，采用 E-test 法检测临床分离的 32 株斯氏放线线菌的药敏，MIC 值≥256 μg/ml 的菌株占 66%[95]。Hays 研究显示，一些棒杆菌属细菌和其他厌氧革兰阳性杆菌中存在的 *erm*（X）基因已在所有克林霉素耐药菌株中检出[95]。

3. 双歧杆菌属（*Bifidobacterium*） 双歧杆菌属细菌定植在胃肠道和阴道。在益生菌食用者中越来越多地观察到侵入性感染，如菌血症的发生[96]。安大略省通过 E-test 法检测临床分离的 41 株双歧杆菌属细菌的耐药性，对青霉素和克林霉素敏感率很高，均为 93%，哌拉西林-他唑巴坦和美罗培南敏感率为 100%[49]。对甲硝唑和头孢西丁敏感率均为 80%。作者使用 Liofilchem MIC 试纸条评估 15 株引起菌血症的双歧杆菌属细菌的敏感性，结果显示青霉素和美罗培南 MIC 低（分别为 0.125～0.500 μg/ml 和 0.016～1.000 μg/ml），但头孢噻肟 MIC 稍高（范围 0.25～8.00 μg/ml）[96]。克林霉素 MIC 范围为 0.032～0.250 μg/ml（除外一株菌 MIC＞256 μg/ml）。15 株分离菌中，环丙沙星 MIC 高值（≥4 μg/ml）的菌株占 80%。该研究中所有 15 株细菌都具有与氟喹诺酮耐药相关的基因突变。15 株细菌对四环素的耐药率为 20%，3 株耐药菌均存在 *tet* 耐药基因。15 株细菌中甲硝唑 MIC 处于耐药范围的菌株占 60%。该研究中，双歧杆菌属细菌敏感性报告与其他研究一致[97]。

4. 皮肤杆菌属（*Cutibacterium*） 革兰阳性无芽胞丙酸杆菌最近发生了重大的分类学变化。传统上，丙酸杆菌属细菌非正式地分类为皮肤型或经典丙酸杆菌[98]。"皮肤型群"包括痤疮丙酸杆菌、贪婪丙酸杆菌、颗粒丙酸杆菌和"肱骨丙酸杆菌"。丙酸杆菌"经典群"包括弗洛伊德丙酸杆菌和丙酸丙酸杆菌，以及其他菌种，如来自乳制品的分离株。2016 年，Scholz 和 Kilian 将许多丙酸杆

菌重组为 3 个新属，即产丙酸杆菌属、皮肤杆菌和假丙酸杆菌属，但保留了丙酸杆菌属，后者包括以前“经典丙酸杆菌”群中的一些细菌[99]。现在，新的皮肤杆菌属包含皮肤型群，包括痤疮皮肤杆菌（以前的痤疮丙酸杆菌）、贪婪皮肤杆菌、颗粒皮肤杆菌和“肱骨皮肤杆菌”。丙酸假丙酸杆菌是假丙酸杆菌属的唯一成员。实验室应考虑采用这些名称报告药敏试验结果并评估皮肤杆菌和丙酸杆菌药敏情况随时间的变化。

皮肤杆菌属与痤疮、心内膜炎、中枢神经系统感染（特别是中枢神经系统分流感染）和骨髓炎相关[100]。具体而言，痤疮皮肤杆菌可引起关节异物感染（特别是肩胛关节，因为腋窝及其周围通常存在大量痤疮皮肤杆菌）[88]。皮肤杆菌是人类皮肤上常见的共生菌，很难确定它们与人类感染的因果关系，除非从同一部位多次培养获得或从无菌部位检出。已发表的关于皮肤杆菌耐药性试验方面的研究数量有限。大多数研究是针对骨科假体感染和痤疮两群患者获得的分离株。由于生物膜形成的特点，骨科皮肤杆菌感染难以治疗。多糖基质中固着细菌形式限制了某些抗菌药物的作用，例如，作用于活跃生长细菌的 β 内酰胺类和糖肽类[101]。

通常青霉素、氨苄西林和头孢菌素类对皮肤杆菌活性强，而克林霉素因菌种而异[49,54]。一项研究使用 E-test 方法检测 271 株痤疮皮肤杆菌和 31 株贪婪皮肤杆菌敏感性，结果显示，对青霉素、哌拉西林-他唑巴坦和头孢西丁敏感，对克林霉素的耐药率为 12.2%[49]。欧洲临床微生物学和传染病学会厌氧菌耐药性监测研究小组 1996—2002 年从欧洲各国收集并在一个中心采用琼脂稀释法检测 304 株痤疮皮肤杆菌，结果显示，青霉素 MIC 值低，范围是 0.032～0.640 μg/ml[102]。克林霉素 MIC 范围是 0.064～64.000 μg/ml（MIC_{90} 0.25 μg/ml）。最近一项单中心研究，采用 E-test 法检测无菌部位分离的 106 株痤疮皮肤杆菌，青霉素敏感率为 100%，但有 8.5% 的菌株对克林霉素耐药[103]。CLSI 发布的抗菌谱显示，基于全球琼脂稀释法检测数据，莫西沙星对痤疮皮肤杆菌抗菌活性强，敏感性为 93%～95%[7,35]。Wright 及其同事报道，106 株痤疮皮肤杆菌中环丙沙星 MIC≥1 μg/ml 的菌株占 2.8%[103]。从 2007—2012 年收集的所有用于 CLSI 药敏谱（antibiogram）分析的菌株均对碳青霉烯类敏感。2018 年最新的 CLSI 药敏谱（antibiogram）报告显示，亚胺培南敏感率仅为 94%，尽管菌株数量有限（$n=18$）[4,35]。与放线菌属一样，皮肤杆菌属甲硝唑 MIC 也高（≥256 μg/ml）[49]。

利福平是一种可穿透生物膜多糖基质的小分子，可与其他抗菌药物联合用于骨科植入感染。尽管对于厌氧菌，目前 CLSI 或 EUCAST 没有对利福平的折点，但监测研究显示，与 Khassebaf 等[104]报道的相似，利福平 MIC 值较低。E-test 检测临床分离的 58 株痤疮皮肤杆菌，利福平 MIC 为≤0.006 μg/ml。尽管不常见，但利福平高 MIC 菌株已有报道。一项研究收集了 8 年临床分离的 684 株痤疮皮肤杆菌，其中，7 株细菌经纸片扩散法检测并由 E-test 确证利福平 MIC>32 μg/ml，这些病例的预后尚不清楚。这些菌株均有 *rpoB* 基因突变。尽管 CLSI 并未提供万古霉素对痤疮皮肤杆菌的临床折点，但区分野生型和非野生型的流行病学折点为 2 μg/ml，这与 EUCAST 革兰阳性厌氧菌敏感折点一致。Crane 等[33]用 E-test 法检测 33 株细菌，MIC_{50} 和 MIC_{90} 分别为 0.38 μg/ml 和 0.50 μg/ml。ESCMID 厌氧菌耐药性研究小组在其大型监测研究中报告万古霉素 MIC_{90} 为 1 μg/ml[102]。

分离自痤疮样病变患者的痤疮皮肤杆菌敏感性报告显示，红霉素、四环素和克林霉素 MIC 升高菌株比例增加[107-108]。据推测，痤疮患者耐药痤疮皮肤杆菌携带率增高的原因为大环内酯类、克林霉素和四环素类药物局部使用量增加所致[109]。大环内酯类药物耐药由 23S rRNA 突变所致，或可通过 *erm*（X）突变获得，四环素耐药则是由 16S rRNA 基因突变所致[101]。

5. 迟缓埃格菌和真杆菌属 迟缓埃格菌[以前称为迟缓真杆菌（*Eubacterium lentum*）]和真杆菌属通常定居在胃肠道，并可能导致菌血症或其他腹腔内感染。埃格菌属引起菌血症报告数量不断增加，发病率和死亡率均高[110-111]。埃格菌始终表现为对第三代头孢菌素耐药[111]。使用琼脂稀释法检测 2000—2013 年血培养分离的 33 株埃格菌属，结果显示，对阿莫西林-克拉维酸、碳青霉烯类、头孢西丁和甲硝唑敏感率为 100%[111]；对克林霉素、莫西沙星和青霉素敏感率分别为 91%、74% 和 39%。随后的研究报道，2008—2010 年青霉素和哌拉西林-他唑巴坦对血培养分离的埃格菌属细菌活性弱[112]。Liderot 及

其同事采用 E-test 法检测临床分离的 18 株细菌，青霉素敏感率为 22%，哌拉西林-他唑巴坦为 17%(根据最新的 2018 CLSI 厌氧菌折点)，莫西沙星为 61%[7]。使用琼脂稀释法检测 2001—2010 年血培养分离的 8 株埃格菌属细菌的药物敏感性，采用当前 CLSI 折点，发现对青霉素或哌拉西林-他唑巴坦均耐药[110]。与埃格菌属相比，真杆菌属对大多数抗菌药物敏感性更高，并且发病率较低[110]。琼脂稀释法检测 6 株真杆菌属细菌，发现对青霉素均耐药，而所有菌株对氨苄西林-舒巴坦、哌拉西林-他唑巴坦、碳青霉烯类和甲硝唑敏感[110]。

6. 乳杆菌属 乳杆菌属菌血症可能与摄入含乳杆菌属的益生菌有关，或者乳杆菌属可能来源于牙齿进入血流[113-114]。乳酸杆菌属细菌也作为正常菌群存在于胃肠道和泌尿生殖道。

大多数在环境大气中生长良好的乳杆菌属细菌对万古霉素天然耐药。万古霉素耐药原因是由于 D-乳酸或 D-丝氨酸取代 D-丙氨酸末端而改变万古霉素结合位点所致[115]。耐万古霉素的乳杆菌属细菌包括干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)和玉米乳杆菌(*Lactobacillus zeae*)。同样，常用作益生菌的乳杆菌属细菌——嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、鼠李糖乳杆菌和罗伊乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)也对万古霉素耐药[115]。相反，大多数主要或严格厌氧条件下生长的乳杆菌属细菌的万古霉素 MIC 低。这些乳杆菌通常来自阴道[116]，包括卷曲乳杆菌、德氏乳杆菌乳亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*)、加氏乳杆菌、惰性乳杆菌、詹氏乳杆菌、约翰逊乳杆菌和阴道乳杆菌(*Lactobacillus vaginalis*)。通常，应根据 CLSI 文件 M45 关于少见或苛养细菌的要求对有氧生长的乳杆菌属细菌进行需氧药敏试验[117]。与 CLSI 文件 M100 中列出的厌氧试验不同，有氧试验建议选择不同的抗菌药物。

关于乳杆菌属细菌药敏试验的文献难以总结，因为各种检测方法已用于各种乳酸杆菌。CLSI、EUCAST 和国际标准化组织/国际乳品联合会等组织提出了不同的检测方法[118]。公布的检测方法各不相同，包括方法学(微量肉汤稀释法、纸片扩散法、琼脂梯度扩散法或琼脂扩散法)、孵育气体环境(厌氧、需氧或微需氧)，以及判读结果之前的孵育时间(24 或 48 h)[119-120]。此外，文献也不一定讨论被测菌是需氧还是厌氧生长。尽管所用的方法不一致，Goldstein 及其同事还是从许多研究中整理了乳杆菌属细菌药敏数据，根据抗菌谱建立了 4 个群[120]。第 1 群和第 2 群主要由需氧菌株组成，对万古霉素耐药(万古霉素 $MIC_{90}>32\ \mu g/ml$)。第 1 群和第 2 群之间，其他抗菌药物的敏感性不同。第 1 群(由干酪乳杆菌和鼠李糖乳杆菌组成)对头孢曲松($MIC_{90}>32\ \mu g/ml$)和厄他培南($MIC_{90}>16\ \mu g/ml$)更耐药，对亚胺培南保持活性(范围 0.25～16.00 μg/ml；MIC_{90} 8 μg/ml)。厄他培南、亚胺培南及头孢曲松对万古霉素耐药的第 2 群乳杆菌属细菌(主要是发酵乳杆菌、植物乳杆菌和阴道乳杆菌)具有活性。克林霉素对第 2 群细菌也具有更好的活性。尽管碳青霉烯类的活性存在差异，但青霉素对耐万古霉素的乳杆菌(第 1 群和 2 群)显示出高活性(青霉素 MIC_{90} 2 μg/ml)。其他两群乳杆菌属细菌(包括卷曲乳杆菌、加氏乳杆菌和约翰逊乳杆菌)(第 3 群和第 4 群)万古霉素 MIC 值低(万古霉素 MIC_{50} 1 μg/ml)。碳青霉烯类药物对第 3 群和第 4 群有抗菌活性，但利奈唑胺对第 3 群细菌 MIC 值较高($MIC_{50}>32\ \mu g/ml$)。Gueimonde 撰写的综述涵盖了乳杆菌属细菌对大环内酯类、克林霉素、四环素和氯霉素耐药的多种耐药机制[115]。

(五)革兰阳性和革兰阴性球菌

在人类感染来源的标本培养获得的厌氧菌中，革兰阳性厌氧球菌约占 1/4[121]。这组厌氧菌是人类口腔和上呼吸道正常菌群的一部分，也是胃肠道、女性泌尿生殖道和皮肤的正常菌群。革兰阳性厌氧球菌引起的口腔感染多为混合感染，通常与黏膜屏障破坏或免疫功能低下有关。革兰阳性厌氧球菌还与下呼吸道厌氧感染有关，例如脓胸或吸入性肺炎。妇科和产科脓毒血症可能由革兰阳性厌氧球菌所致。最后，革兰阳性厌氧球菌也与糖尿病足感染高度相关[121]。与脆弱拟杆菌或其他革兰阴性厌氧杆菌相比，它们不是血液感染或腹腔感染的常见病因。

厌氧革兰阴性球菌包括韦荣球菌属和巨球菌属等。韦荣球菌是临床微生物学实验室分离的最常见厌氧革兰阴性球菌。它是上呼吸道和胃肠道正常菌群，如果这些解剖部位防御能力受损，则可能引起疾病。韦荣球菌属常从混合感染中检出。因此，对其毒力了解甚少[122]。

过去20年中，厌氧革兰阳性球菌曾比任何其他厌氧菌群数量都多[122]。例如，超过13个菌属，之前都归在曾经是最大的厌氧菌属之一的消化链球菌属[9,122]。现在，消化链球菌属仅有4个菌种：厌氧消化链球菌、犬消化链球菌（*Peptostreptococcus canis*）、拉塞尔消化链球菌和口腔消化链球菌。

最常见与人类感染有关的革兰阳性厌氧球菌包括大芬戈尔德菌、微小微单胞菌、黑尔嗜胨菌和不解糖嗜胨菌[123-125]。通常认为，许多抗菌药物对这些细菌有效。不解糖嗜胨菌、大芬戈尔德菌和微小微单胞菌常对青霉素敏感。一项对革兰阳性厌氧球菌的调查显示，青霉素和克林霉素耐药率约为7%，阿莫西林-克拉维酸耐药率约为3.5%[126]。β内酰胺类复合制剂和头孢菌素类常有活性[126-127]。碳青霉烯类和甲硝唑活性极高[127]。相反，在某些调查中，革兰阳性球菌对克林霉素耐药率接近30%[128]。在另一项包括113株革兰阳性厌氧球菌的耐药性调查中，所检测的抗菌药物中四环素耐药率最高(42%)[126]。

在革兰阳性厌氧球菌中，大芬戈尔德菌因其对青霉素和克林霉素耐药率高而受关注。大芬戈尔德菌最常感染的部位是皮肤和软组织及骨骼和关节[122]。大芬戈尔德菌还携带似乎与细菌致病机制相关的毒力因子，其中一些是宿主细胞黏附因子[129]。大芬戈尔德菌对青霉素和克林霉素等抗菌药物耐药率为10%～20%[39,123,126,130]。例如，Wren[124]报道，大芬戈尔德菌和微小微单胞菌对青霉素耐药率分别为16%和8%。在另一项调查中，98株大芬戈尔德菌对克林霉素耐药率为13%，而厌氧消化链球菌(n=92)为1%，微小微单胞菌(n=146)<1%[1]。尽管相对于克林霉素而言，大芬戈尔德菌对甲硝唑的耐药率要低得多，但在一些大规模调查中，甲硝唑的耐药率高达3%[61]。

除了大芬戈尔德菌外，其他革兰阳性球菌在调查中显示出较高的耐药率。尽管不解糖嗜胨菌和普雷沃厌氧球菌青霉素敏感性与其他厌氧革兰阳性球菌相似，但已注意到这些菌种对克林霉素 MIC_{90} 值高，为>32 μg/ml[127,131]。

在一项调查中，厌氧消化链球菌对青霉素耐药率高（7%），而其他厌氧革兰阳性球菌<1%[126]。比较厌氧消化链球菌和口腔消化链球菌之间的抗菌药物敏感性，发现前者对阿莫西林-克拉维酸耐药率较高，并且对许多其他抗菌药物 MIC_{50} 和 MIC_{90} 值始终较高[132]。因此，菌种鉴定可以成为重要的治疗指南。

黑尔嗜胨菌是从皮肤和软组织感染中分离的另一种革兰阳性厌氧球菌，通常对多种抗菌药物表现为低MIC[133]。该菌种可能因生化反应类似于不解糖嗜胨菌而难以鉴定，并且在过去可能已被误认为不解糖嗜胨菌[133]。因此，以前不解糖嗜胨菌药敏报告可能受到鉴定错误的影响。

一般来说，韦荣球菌属对几种抗厌氧菌药物高度敏感，例如，青霉素类、β内酰胺类复合制剂、碳青霉烯类、克林霉素和甲硝唑。最近荷兰对韦荣球菌的一项调查，确实未发现对阿莫西林、阿莫西林-克拉维酸、克林霉素或甲硝唑耐药[31]。

尽管尚未对厌氧球菌的耐药机制进行广泛研究，但Reig及其同事推测，青霉素结合蛋白可能解释韦荣球菌属中偶尔出现的青霉素MIC升高的现象，因为在耐青霉素的韦荣球菌属细菌中未检测到β内酰胺酶[134]。同样，革兰阳性球菌对青霉素的耐药性也认为是由于青霉素结合蛋白引起的[135]。厌氧菌对克林霉素的耐药性是由于核糖体50S亚基中药物作用部位的23S rRNA甲基化所致[55]。在大量厌氧革兰阳性球菌中已检测到硝基咪唑 *nimB* 基因，但它并不总是与甲硝唑耐药相关。在Theron及其同事的一项研究中，21株对甲硝唑敏感的革兰阳性球菌中，90%存在 *nimB* 基因[136]。因此，*nimB* 基因的存在本身不足以表达对甲硝唑的耐药性。

三、药敏试验和药敏数据报告的策略

(一)药敏试验指南

为了患者管理，下列情况应进行厌氧菌药敏试验：①有效抗菌药物的选择对疾病管理至关重要；②考虑长期治疗以进行临床管理；③从特定无

菌部位分离的厌氧菌；④常规治疗方案失败（表77-3）。表77-4列举了应进行厌氧菌药敏试验的情况。大多数厌氧菌感染是混合感染，因此很难确定哪些分离株需要处理。在对来自混合感染的分离株进行药敏试验时，应重点确定已知耐药性更高的菌种。这些菌种包括但不限于拟杆菌属或副拟杆菌属、沃兹沃思嗜胆菌、无害梭菌、产气荚膜梭菌、多枝梭菌、梭杆菌属、普雷沃菌属和沃兹沃思萨特菌[1,3]。单纯厌氧菌感染时，也应进行药敏试验。较少引起单纯厌氧菌感染的细菌包括产气荚膜梭菌、败毒梭菌和索氏梭菌。

表 77-3 建议用于厌氧菌试验和报告的抗菌药物

药物分组	抗菌药物	
	革兰阴性厌氧菌	革兰阳性厌氧菌
首选测试和报告的抗菌药物（CLSI 中，M100 文件中的表 1C，A 组）	阿莫西林-克拉维酸 氨苄西林-舒巴坦 哌拉西林-他唑巴坦	氨苄西林 青霉素
	克林霉素	阿莫西林-克拉维酸 氨苄西林-舒巴坦 哌拉西林-他唑巴坦
	多利培南 厄他培南 亚胺培南 美罗培南	克林霉素
	甲硝唑	多利培南 厄他培南 亚胺培南 美罗培南
		甲硝唑
选择性测试和报告的补充抗菌药物（CLSI 文件 M100 表 1C C 组）	青霉素 氨苄西林	头孢唑肟 头孢曲松
	头孢替坦 头孢西丁	头孢替坦 头孢西丁
	头孢唑肟 头孢曲松	四环素
	氯霉素	
	莫西沙星	莫西沙星

注：本表经临床和实验室标准协会（M100，CLSI）许可改编而成。在正常情况下，同一栏内只需要检测一种抗菌药物，因为同一栏内抗菌药物表现出相似的临床疗效和结果解释

表 77-4 厌氧菌药敏试验适应证

指征	举例
监测	
每年监测单个医疗中心的分离菌	拟杆菌属、副拟杆菌属、普雷沃菌属、梭杆菌属、梭菌属、沃兹沃思嗜胆菌
临床	
对常用抗菌药物耐药率上升的特定菌种的复苏	拟杆菌属、副拟杆菌属，或梭杆菌属
适当治疗方案临床失败	任何厌氧菌
在临床结果中起关键作用的抗菌药物	与骨髓炎或关节感染有关的拟杆菌属
需要长期治疗	与骨髓炎、心内膜炎、脑脓肿、肝脓肿或肺脓肿有关的拟杆菌属、普雷沃菌属或其他厌氧菌
特定部位的感染	任何与脑脓肿、心内膜炎、假体装置或移植物感染、菌血症有关的厌氧菌

注：示例仅为建议，并不代表所有内容。请参阅正文以获取具体建议

CLSI文件M100表1B提供了厌氧菌药敏试验检测和报告时应考虑的抗菌药物分组建议[7]。CLSI文件表中所列抗菌药物分组考虑的因素包括该药物的治疗适应证、耐药率和耐药机制。表77-3列出了建议厌氧菌检测和报告的抗菌药物。

CLSI建议，在咨询医院各委员会，例如，医务处和抗菌药物管理团队和部门(如药房、感染科和感染控制部门)之后，再选择最合适的抗菌药物进行检测和报告。需要考虑的其他因素包括该药物的临床疗效、本机构的耐药率、抗菌药物的成本，FDA临床适应证及当前抗菌药物处方。表77-3同一栏中所列抗菌药物具有相似的临床疗效和解释类别。

革兰阴性厌氧菌可以检测青霉素和氨苄西林。可以获得抗菌药物的MIC，并选择性地报告。如果革兰阴性厌氧菌β内酰胺酶试验阳性，应报告该菌对青霉素和氨苄西林耐药。但是，β内酰胺酶试验阴性不能推断受试菌对青霉素和氨苄西林敏感，因为革兰阴性菌对β内酰胺类药物耐药的其他耐药机制已有报道[7]。因此，如果治疗拟选用青霉素和(或)氨苄西林，则应对β内酰胺酶阴性菌株进行青霉素和(或)氨苄西林药敏试验，以确定该菌株对所用药物的敏感性。

对于革兰阳性厌氧菌，甲硝唑耐药在许多革兰阳性无芽胞杆菌如放线菌中常见，推荐革兰阳性厌氧菌主要检测氨苄西林和青霉素敏感性，因为许多细菌β内酰胺酶呈阴性。如上文针对革兰阴性厌氧菌所述，如果β内酰胺酶试验呈阳性，则青霉素或氨苄西林无论实际检测MIC值如何，均应报告为耐药。CLSI尚未建立厌氧菌的阿莫西林折点。然而，阿莫西林认为等同于氨苄西林[7]。从人类感染分离的产气荚膜梭状芽胞杆菌几乎普遍对青霉素和克林霉素敏感，一些实验室选择对该菌不常规进行药敏试验[35,54]

CLSI文件M100表1C的C组所列抗菌药物作为补充药物，应选择性报告。这些抗菌药物在机构或特定患者检出耐药菌时有用。此外，对替代性抗菌药物进行药敏试验也有助于对首选药物过敏患者及罕见菌株感染患者的治疗。

(二)抗菌谱

从临床实验室收集的信息可用于确定特定病原菌、抗菌药物和区域的耐药流行状况。从根本上说，耐药具有地域性，耐药性监测数据(例如，抗菌谱)可指导临床医生选择经验性使用抗菌药物治疗(例如，未培养病原菌或病原菌已鉴定尚未测定MIC时的治疗)。同一地点持续数年的监测可以了解耐药增长的速度或抗菌药物暴露改变是否降低耐药率。此类纵向研究有很多条件，包括不变的折点、稳定的患者人群以及每年样本的可比性。因此，抗菌药物敏感性试验方法、折点的确定及折点委员会是否同意对解释监测数据至关重要，这些因素有时会影响厌氧病原菌药敏结果的解释。

各医院应定期监测本单位厌氧菌的耐药率。理想情况下，应该每年执行一次。Hecht等[137]的研究结果表明，尽管地理位置相隔不远，但各医院之间抗菌谱可能存在很大差异。因此，各机构确立抗菌谱以总结厌氧菌耐药特点，有助于患者抗菌药物的经验治疗。目前正在修订的CLSI文件M39指南提供了有关正确收集、分析和描述累积抗菌药物敏感性试验数据的详细信息[138]。当前指南要求至少收集一年，每个菌种不少于30株细菌，以产生有意义的数据。但是，如果病原菌分离频率低于此水平，实验室可以选择合并1年或1年以上数据，以使菌株数量满足最低要求。为了实现最佳监测，建议每个菌种检测75～100株细菌[138]。监测应包括具有重要临床意义的拟杆菌属和梭菌属细菌。如果可能的话，也应考虑将普雷沃菌属、梭杆菌属和其他常见病原菌包括在内。CLSI厌氧菌工作组(CLSI Anaerobe Working Group)在文件M100附录中添加了一份多中心药敏谱(antibiogram)数据，该附录每隔几年更新一次，作为资源，供无法形成本单位抗菌谱机构使用[7]。

如果临床实验室无法进行厌氧菌药敏试验，则CLSI文档M100和M11[4-7]中厌氧菌抗菌谱数据可供实验室和临床医生参考。实验室人员在等待参考实验室药敏试验结果时可以参考该抗菌谱。已发布的抗菌谱提供了各种抗菌药物经验性敏感率的适时数据；但应认识到，CLSI提供的厌氧菌抗菌谱数据来自全球范围内分离的菌株，可能不适用于特定医院或区域中的分离株。

四、总结

临床实验室越来越多地使用蛋白质组学和分子技术鉴定厌氧菌，从而得到更准确的种水平的鉴定报告。虽然只是传闻，有些人认为临床医生正更多地要求对厌氧菌进行药敏试验。过去，厌氧病原菌常仅报告广义名称，如"革兰阳性厌氧菌"，而现在常报告属和种名。此外，在解释不同地区抗菌药物耐药性趋势和特点时，应考虑分类更新和随时间推移准确鉴定病原菌能力的增强。因此，随着更多新技术为临床微生物学实验室采用，厌氧菌药敏试验的需求可能会增加。

关于药敏试验的经验信息对于临床医生治疗厌氧菌感染患者特别有用。与许多需氧细菌相比，厌氧菌倾向于缓慢生长，并且通常在药敏试验结果出来之前就可以很好地鉴定。另外，厌氧菌通常存在于需氧菌和厌氧菌的混合感染中或与其他厌氧菌混合存在。因此，可能难以获得纯培养物用于药敏试验。在这种情况下，基于在局部地区流行菌株的信息了解预测的厌氧菌敏感性特点也是有帮助的。

无论是从研究质量，还是从涵盖的细菌种类来看，厌氧菌耐药性和耐药趋势的调研结果各不相同。耐药特点因地区而异，并且某些耐药率随时间推移发生了显著变化。目前尚不清楚地区之间的差异有多少是由于真正的地区差异、方法学检测差异或不同折点的应用造成的，值得密切关注呈上升趋势的耐药特点包括：①所有厌氧菌对克林霉素的耐药性增加；②拟杆菌属细菌对β内酰胺类复合制剂耐药；③拟杆菌属细菌由于产金属β内酰胺酶而出现对碳青霉烯类药物耐药；④除拟杆菌属以外，目前也包括厌氧革兰阳性球菌和杆菌对甲硝唑耐药。

与需氧菌一样，厌氧菌已进化出多种抗菌药物耐药机制。这些耐药机制包括位于细菌染色体上或可移动遗传元件（质粒或转座子）内的基因，这些基因通过表达降解抗菌药物或改变药物靶标的酶而产生耐药性。临床实验室应提供厌氧菌药敏试验，以优化对患者的护理。对厌氧菌进行更频繁的药敏试验将有助于更好地对耐药性进行流行病学调查。

参考文献请扫二维码查阅

第78章　抗菌药物敏感性试验方法：分枝杆菌、诺卡菌和其他放线菌

GAIL L. WOODS, SHOU-YEAN GRACE LIN, BARBARA A. BROWN-ELLIOTT, EDWARD P. DESMOND

（余方友　译；鲁炳怀　审校）

世界卫生组织（World Health Organization，WHO）将耐药结核病描述为“重大的公共卫生威胁并影响到结核病的控制”[1]。全球每年出现的多重耐药（multidrug-resistant，MDR）结核病例数约为500 000[2]。MDR结核病的定义为因感染了对异烟肼（isoniazid，INH）和利福平（rifampin，RIF）耐药的结核分枝杆菌所导致的结核病。在标准的抗结核治疗中，这2种药物最有效。尽管绝大多数结核病例及耐药结核病例存在于发展中国家，但该病在工业化国家中也有一个显著的占比，新发结核病例通常主要为外来移民。耐药结核病是全球性的医学问题，但幸运的是，更快速的耐药检测方法随着耐药结核病的出现也已被开发出。WHO认可的结核病诊断和药敏试验手段包括液体培养、赛沛（Cepheid）的GeneXpert MTB/RIF和线性分子探针法[1,3]。美国专门召集工作组来制定控制耐药结核病的计划，该计划特别强调增强临床实验室准确且快速鉴定耐药结核病能力的必要性[4]。除了检测技术的进步，新的药物也逐步面世，这些都有助于应对耐药结核病不断增长的新挑战。

增强临床实验室快速鉴定耐药结核病及开展二线抗结核药物敏感性试验（drug susceptibility testing，DST）的能力是提升对抗广泛耐药结核病（extensively drug-resistant TB，XDR-TB）的主要内容。XDR-TB不仅对利福平、异烟肼耐药，而且对喹诺酮与至少对一种注射药物也耐药，其中包括阿米卡星（amikacin，AMK）、卡那霉素（kanamycin，KAN）或卷曲霉素（capreomycin，CAP）。这些病例在诊疗和防控上都非常棘手[5]。对于XDR-TB患者而言，依据一、二线药物DST结果开展个体化治疗才可能取得成效。这些治疗同时包括不良事件管理、营养和心理支持[6]。然而很多情况下，大多数XDR-TB患者会因之而死。这些情况包括诊断延误、无法获得二线抗结核药物DST结果，以及HIV共感染，抑或是上述几种因素的不同组合。

本章描述了非放射性短期孵育肉汤培养系统（商品化的微量滴定法），以及基于固体琼脂的标准比例法。同时也会介绍基于显微镜下观察的药敏试验法（microscopic observation drug susceptibility，MODS）[7-8]，这是一种不需要频繁使用昂贵的进口专利原料的方法，价格低廉，适用于资源匮乏的地区。关于耐药性检测的分子生物学方法，将在本书第32章“结核分枝杆菌复合群（*M. tuberculosis* complex，MTBC）”介绍。

正如前面章节所介绍的，感染非结核分枝杆菌（nontuberculous mycobacteria，NTM）和需氧放线菌也可导致人体的严重疾病。随着消除结核病目标的逐步实现，NTM将会在人分枝杆菌病中的占比中逐步增加。针对NTM和需氧放线菌感染的DST检测可为治疗提供有用的指导，这一部分内容也将在本章中讨论。

一、抗菌药物

虽然用于治疗分枝杆菌病的抗菌药物种类繁多，但并不是所有的药都适用于所有类型的感染。特别当面对耐药现象时，选择替代治疗方案将会面临困难，这时候主要依靠临床经验。对于罕见

的分枝杆菌感染，由于缺乏临床用药先例，或者对药效不明确，临床医生在选择治疗方案时经常进退两难。特别是在为了改善疗效、避免产生耐药性或克服某种分枝杆菌固有耐药而需要联用几种药物时，这种情况就变得尤为复杂。

下文讨论用于抗分枝杆菌感染的抗菌药物。首先讨论主要的抗结核药物，随后按字母顺序介绍其他药物。推荐用于治疗结核病和最常见NTM感染的药物在表78-1[9-10]中作了总结。对结核病而言，一线药物毒性较弱，可经口服，通常用于治疗不太复杂的病症。临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute，CLSI)最近发布的关于分枝杆菌DST检测的文件中[11]公布的抗结核药物包括INH、RIF、乙胺丁醇(ethambutol，EMB)和吡嗪酰胺(pyrazinamide，PZA)。更新版的M24文件即将面世，关于这一部分，请看本章末尾关于预估更新内容的总结。链霉素(streptomycin，STR)在几年前被美国移入二线抗结核药物中(当一线疗法失败或者患者无法耐受时使用)。二线抗结核药物包括注射类的AMK、CAP、KAN和STR；喹诺酮类药物，如LEV和MOX；以及其他口服药物，包括乙硫异烟胺(ethionamide，ETH)、对氨基水杨酸(p-aminosalicylic acid，PAS)、环丝氨酸(cycloserine，CS)、氯法齐明、利奈唑胺、氨硫脲、贝达奎林(bedaquiline，BDQ)。使用这些药物通常导致更严重的不良反应，并且它们中某些的抗结核菌的效能未知。

表78-1 推荐用于常见分枝杆菌感染初次治疗的抗菌药物[a]

分枝杆菌种菌种，复合物或族	感染部位	抗菌药物
结核分枝杆菌复合群[b]	任何部位	异烟肼＋利福平＋乙胺丁醇＋吡嗪酰胺。其他治疗多重耐药结核病药物包括氨基糖苷类(阿米卡星、卡那霉素、链霉素)、卷曲霉素、氯酚苯嗪、乙硫异烟胺、喹诺酮类(氧氟沙星、左氧氟沙星、莫西沙星等)、环丝氨酸、利奈唑胺、-氨基水杨酸，胺硫脲胺和新批准的贝达喹啉，但不局限于这些药物
鸟分枝杆菌复合群	肺	克拉霉素[c]＋乙胺丁醇＋一种利福霉素(利福平或利福布丁)；用于治疗空洞和严重疾病的阿米卡星或链霉素
播散型	克拉霉素[c]＋乙胺丁醇±利福布丁	
堪萨斯分枝杆菌	肺	利福平＋乙胺丁醇＋克拉霉素，或异烟肼＋利福平＋乙胺丁醇
海分枝杆菌	皮肤、软组织[d]	克拉霉素＋乙胺丁醇，克拉霉素＋利福平或利福平＋乙胺丁醇
快速生长分枝杆菌[e]	皮肤、软组织[d]	基于药敏试验结果，克拉霉素(若敏感)＋≥1种其他药物
脓肿分枝杆菌复合群	肺	若克拉霉素敏感，根据药敏结果制定包括克拉霉素在内的多药方案

注：[a] 推荐用于NTM的药物，依据参考文献[9]；[b] 几乎所有的(>95%)牛分枝杆菌对吡嗪酰胺耐药；[c] 阿奇霉素是一种可接受的替代药物；[d] 外科清创术对治疗成功可能很重要；[e] 最常见的种类有偶发分枝杆菌、脓肿分枝杆菌复合群和龟分枝杆菌复合群

在MTBC中，耐药现象以较低频率随机发生，这通常是单一突变的结果。常见2种耐药类型分别为原发性耐药和获得性耐药。原发性耐药指的是结核患者在接受抗结核治疗前就已经感染了耐药菌株；获得性耐药是指当进行抗结核药物治疗时，由于治疗不足而产生针对任何抗结核药物的耐药现象。

在MTBC中，已知的与耐药有关的基因将在第32章介绍[12]。MTBC中的耐药机制仍未得到充分阐明，到目前为止，这些机制可大致分为5类，包括：在休眠期抗酸杆菌上发现的药物摄取水平降低、结构型β-内酰胺酶使药物失活、氟喹诺酮耐药时的药物外排泵活性增强，以及下文将会提到的RIF和INH中药物靶标的改变和INH和PZA耐药中可见的药物前体激活酶丰度降低[12]。

(一)异烟肼(isoniazid，INH)

INH是一种合成于1952年的特异性抗结核强效杀菌药物。INH具有相对较低的毒性且对几乎所有MTBC野生菌株都有抗菌活性。虽然INH发挥抗菌活性的机制尚未阐明，但目前的研究表明该过程很可能涉及由*katG*编码的触酶/过氧化物酶催化的氧化反应[13]。氧化态的INH可与NADH(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸，还原型辅酶

Ⅰ)的烟酰胺部分共价结合形成 INH-NADH 化合物，该化合物与 NADH 竞争结合由 *inhA* 编码的烯醇酰基载体蛋白还原酶[14]。

INH 主要作用于分枝菌酸的合成。对 INH 耐受的菌株表现为细胞脆性增强，细胞内黏度增加，细胞疏水性降低，以及抗酸特性消失[15]。分枝菌酸是脂肪酸合成酶系Ⅰ和Ⅱ的产物，后者合成种特异性长链分枝菌酸。活化的 INH 将脂肪酸合成酶系Ⅱ中的成员之一的烯醇酰基载体蛋白还原酶 InhA 作为靶标。此外，INH 也可能干扰 NAD 代谢、能量代谢和大分子生物合成[16-17]。

INH 作用机制和其耐药机制有关。Banerjee 等[18]报道了在 MTBC 中，INH 和 ETH 的耐药与 *inhA* 的一个错义突变有关。另外也有其他研究表明，*katG* 突变占 INH 耐药原因中的 30%～60%[19]。在临床上，*inhA* 启动子区的突变会产生 INH 低水平耐药这一关系并非总是具有显著性[20]。*ahpC*(编码烷基氢过氧化氢还原酶)启动子区的突变也被报道与 INH 耐药相关[21-22]。

在有氧条件下，INH 仅对处于复制中的结核分枝杆菌起作用。当结核患者接受单剂治疗时，INH 耐药性很快就会产生。在结核分枝杆菌的某些群落中，INH 耐药频率为 10^{-6}～10^{-5}。INH 的不良反应包括罕见的与年龄相关的肝炎、较少见的周围神经病变和超敏反应，例如，发热、皮疹和关节痛。

(二)利福平(rifampicin，RIF)

RIF 于 1968 年开始被用于抗结核治疗。当结核分枝杆菌被宿主吞噬后，该药对在干酪样病灶处慢速复制及开放空腔处活跃复制的结核分枝杆菌都有效。RIF 对其他一些慢生长的分枝杆菌也有抗菌效果，但对快速生长的分枝杆菌(rapidly growing mycobacteria，RGM)无抗菌活性。RIF 因其亲脂性，能较容易通过分枝杆菌细胞膜而扩散进入细菌胞内。通过结合 DNA 依赖的 RNA 聚合酶的 β 亚基，RIF 可抑制转录。RNA 聚合酶 β 亚基的编码基因 *rpoB* 的突变可导致对 RIF 的耐药性[23-24]。研究表明，RIF 耐药表型中 rpo B81-bp 核心区的突变占比超过 96%[25]。随着分子生物学药敏检测的深入，在 MTBC 中又发现了又个新的 *rpoB* 突变，均可改变该菌对 RIF 的耐受性。但标准的药敏检测法，如液体培养法，即分枝杆菌生长指示管(mycobactierial growth indicator tube，MGIT)发现这些突变导致的 MIC 升高幅度不足以产生 RIF 耐药的结论。这些突变的临床意义是未知的，但有研究报道它们与一些治疗失败的案例有关[26-27]。

该药物的不良反应包括肝毒性、胃肠道不良反应、超敏反应及包括尿、泪液、其他体液甚至是软性隐形眼镜在内的橘红色变色。RIF 可增加如美沙酮和避孕药等其他药物肝代谢负担。特别需注意的是，RIF 与含蛋白酶抑制剂的利福布丁(rifabutin，RFB)有较低程度的药物相互作用。这种相互作用可增加肝代谢负担，从而导致一些抗病毒药物处于亚治疗水平[28]。

(三)利福布丁(rifabutin，RFB)和利福喷丁(rifapentine)

利福布丁(RFB，安沙霉素，为螺旋哌啶基利福霉素)和利福喷丁(rifapentine，一种环戊基利福霉素)在体外均具有 MTBC 抑菌活性。RFB 对鸟分枝杆菌复合群(*Mycobacterium avium* complex，MAC)也有很好的抗菌作用。这 2 种药物的作用模式及细菌耐药机制似乎都与 RIF 相似，但在 MTBC 中，约 30%RIF 耐药菌株对 RFB 和利福喷丁敏感，这一表型和 *rpoB* 中某些特定位点的突变有关[29]。在分析 MTBC 的临床菌株对利福霉素的交叉耐药现象时，Yang 等发现第 513 位和 531 位密码子的改变与细菌对 RIF 和 RFB 的耐药有关；第 516 位和第 529 位密码子的点突变、第 518 位密码子的缺失突变和第 514 位密码子的插入突变可影响到细菌对 RIF 的敏感性，但不影响 RFB；而第 515 位、521 位和 533 位密码子的改变不影响细菌对 RIF 和 RFB 的耐药性[30]。和 RIF 一样，RFB 和利福喷丁都被代谢为相应的有生物活性的 25-去乙酰基代谢物。RFB 已被批准作为 HIV 患者预防性药物，可降低播散性 MAC 病的发病率。除了比 RIF 抗菌活性更强(与体重相关)外，RFB 在人体中具有较长的半衰期。RFB 在组织，特别是肺组织中的药物浓度比在血清中高 10 倍。

RFB 引起的药物不良反应与 RIF 类似，其中包括上文提到的与抗逆转录药物联用时的不良反应[28]。RFB 特有的一些毒性反应包括白细胞减少症、血小板减少症，以及与克拉霉素联用时的关节痛和葡萄膜炎。

(四)乙胺丁醇(ethambutol)

EMB是一种人工合成的抗结核药物,1961年开始应用。其药效仅针对处于生长期的结核分枝杆菌。对慢速生长的NTM,EMB的药效具有可变性。EMB主要的作用机制是抑菌性。抑制细菌细胞壁的合成,有研究表明EMB可抑制阿拉伯半乳聚糖的合成[32]。在MTBC中,对EMB耐药的突变频率约为10^{-5},有证据表明,EMB耐药与编码阿拉伯糖基转移酶的*embB*基因第306位密码子的特异性突变有关[33-34]。这一突变导致MTBC对EMB高水平耐药,然而,这一突变仅占耐药菌株中的70%,即其他基因的突变也会起到一定的补充作用[12]。*embB*第306位密码子的突变可能也会影响细菌对其他用于抗结核治疗药物的耐药性[35]。

EMB是治疗MAC病的推荐用药,但其体外药敏试验的MIC值与临床治疗的响应情况不具有相关性[36]。因此,EMB强烈不被推荐作为MAC药敏试验的测试药物。EMB可能通过影响MAC的细胞膜通透性进而提高其他更高效的药物的细胞内浓度[37]。

使用EMB所带来的最重要的不良反应是因用药引起视神经炎从而导致视力下降。这与用药周期和剂量有关。在尚且有其他药物可用的情况下,EMB不被推荐用于儿童结核病的治疗,这是因为他们年龄太小而不能监测用药后的视力变化。EMB引起的视力减退,在停药后多可恢复。

(五)吡嗪酰胺(pyrazinamide,PZA)

PZA是烟酰胺的人工合成的衍生物(吡嗪类似物),当与INH联用时,可以将处于复制中或非复制期的MTB迅速杀灭。PZA对包括牛分枝杆菌在内的其他分枝杆菌无效,对PZA敏感的牛分枝杆菌仅偶见报道。PZA仅在酸性条件下起作用。因此,若要在体外药敏试验中准确检测PZA的耐药性,则必须调节培养基的pH。很可能PZA仅在吞噬溶酶体的酸性环境中才有活性,该活性依赖于感染部位药物的摄取浓度,故而最终结果可能是抑菌或是灭菌。PZA在肝中被水解为有活性的代谢产物——吡嗪酸。即使该药作用机制并未被完全揭示,但目前的证据表明PZA的药效依赖于这一化学转化。MTB可产生吡嗪酰胺酶,绝大多数PZA耐药的MTB都缺乏该酶。然而,一些PZA耐药菌株仍保留吡嗪酰胺酶活性,这表明还存在其他耐药机制,如药物外排泵[38]。

吡嗪酰胺酶活性缺失及进而导致的PZA耐药性与编码吡嗪酰胺酶的*pncA*上的某些突变有关[39]。实际上,目前发现72%~97%的PZA耐药性的产生都源于*pncA*突变。

PZA的不良反应包括肝毒性、少见的光敏感性和皮疹。PZA治疗可导致高尿酸血症,因此,痛风是重要的禁忌证。在抗结核短期治疗的前2个月,PZA常不再给药,而INH和RIF继续给药4个月。

(六)氨基糖苷类抗生素(aminoglycosides)

用于抗分枝杆菌感染的氨基糖苷类抗生素包括STR、KAN和AMK。AMK是KAN的衍生物并且它在氨基糖苷类中药效最强但耳毒性不一定最低。血清中一般浓度的庆大霉素对于分枝杆菌无效,而妥布霉素仅对龟分枝杆菌有效。

该类抗生素的主要作用机制是通过阻止转运RNA与核糖体E位的结合从而抑制蛋白质合成的转位之前或之后的步骤。AMK的使用经常会导致*rrs*(16S rRNA编码基因)的耐药突变的发生从而引起氨基糖苷类药物的交叉耐药,但STR或KAN的耐药可能不会引起与AMK的交叉耐药[40]。对KAN耐药而对AMK敏感的菌株可能在*eis*启动子区有突变。AMK经常与其他一种或多种药物联用来治疗由RGM或MAC引起的严重感染。

MTBC中STR耐药的分子基础来源于核糖体蛋白S12编码基因*rpsL*或*rrs*区域的突变。在核糖体结构组装时,这两者连接在一起[41-42]。Finken等[41]通过分析38例STR耐药菌株发现其中*rpsL*突变占20例,*rrs*突变占9例。Nair等分析了*rpsL*的基因序列并在少量的菌株中发现STR耐药与该基因第43位密码子的点突变有关。氨基糖苷类药物的不良反应包括听力减退、耳鸣、平衡感丧失和肾衰竭。

(七)氨苯硫脲(amithiozone)

氨苯硫脲(噻唑酮、替比昂或苯二酮)属于硫代半咔唑,对MTBC有效。当单剂给药时会很快

地产生耐药性。不良反应包括胃肠道刺激和骨髓抑制。当同时接受 INH 治疗时可能会导致肝毒性。另外，HIV 阳性结核患者接受含氨苯硫脲的药物治疗时，可能会并发 Stevens－Johnson 综合征和严重的表皮坏死松解症，两者具有关联性[43]。因此，氨苯硫脲不推荐用于已知或怀疑感染 HIV 的结核患者。因为较强的不良反应，氨苯硫脲在美国未上市，欧洲也不使用，但在一些非洲国家，该药物与 INH 的联用能成功用于抗结核治疗，在这些地区，通常认为氨苯硫脲的不良反应不那么严重。

(八)贝达喹啉(bedaquiline)

二芳基喹啉的抗结核潜力早在 2005 年就被报道[44]。作为该类药物之一的 TMC207，或叫作贝达喹啉(bedaquiline，BDQ)似乎可以缩短 MDR 结核患者痰培养转阴的时间[45]。在 2012 年末，美国 FDA 批准将该药物用于结核病治疗[46]。二芳基喹啉具有新的抗结核作用机制，例如，抑制分枝杆菌 ATP 合酶的活性。在撰写本章内容期间，还未开发出用于 BDQ 的实验室药敏试验标准操作方法。细菌对 BDQ 的耐药涉及 ATP 合酶 C 环的突变，包括 Asp28Gly、Asp28Ala、Leu59Val、Glu61Asp、Ala63Pro 和 Ile66Met 等突变。肉汤稀释法结果表明这些突变会使 MIC 增高至 0.25～4.00 μg/ml(野生型为 0.03 μg/ml)[47]。然而实验室中也构建出其他不含 ATP 合酶突变的 BDQ 耐药菌株，说明存在其他的耐药机制[48]。也有研究报道用 BDQ 治疗 MAC 感染[49-50]。

(九)卷曲霉素(capreomycin，CAP)

CAP 是一种从可变链霉菌的缠绕链霉菌亚种中分离出来的大环多肽抗生素。它是一种重要的注射药物，可用于治疗耐药结核病。CAP 作用机制与氨基糖苷类药物类似：干扰蛋白质翻译过程。一般认为 CAP 是抑菌药物，但体外实验表明该药物可杀灭非复制状态的结核分枝杆菌[51]。16S rRNA 编码基因(*rrs*)或 *tlyA* 的突变可引起细菌对 CAP 的耐药性[52]。

(十)氯法齐明(clofazimine)

氯法齐明是亚氨基吩嗪(亮红色染料)替代物。氯法齐明对麻风分枝杆菌的杀菌性较弱，但是该药物通常与 RIF 及二氨二苯砜联用，作为麻风病的常规治疗手段。然而，使用氯法齐明并产生明显的组织抗菌活性可能需要多达 50 天的时间，这可能影响麻风病治疗的临床响应时长。此外，含氯法齐明的治疗方案对于脓肿分枝杆菌复合群和 MAC 引起的肺部疾病也有一定效果[53-55]。

氯法齐明作用机制仍不明确，不过这种药物具有高亲脂性，可优先与分枝杆菌 DNA 结合，并且它的半衰期非常长(估计可达到 70 天)。该药往往堆积在脂肪组织和网状内皮细胞系统内。不良反应主要限于皮肤、结膜、角膜和体液的变色(粉红或红色)，以及胃肠道的不耐受。

(十一)环丝氨酸(cycloserine)

右旋环丝氨酸(D-cycloserine，D-CS)是 D-丙氨酸类似物，可抑制作为分枝杆菌细胞壁重要组分的 D-丙氨酰基-D-丙氨酸的合成。CS 对所有分枝杆菌都有效，对其他几类细菌也有效。尽管 CS 是二线抗结核药物之一，但是它的体外药敏试验却存在技术困难[11]。CS 用药会导致严重的不良反应，特别是周围神经病变和中枢神经系统功能障碍，包括癫痫和精神障碍。

(十二)二氨二苯砜(dapsone)

二氨二苯砜(dapsone，diaminodiphenyl sulfone)是人工合成的化合物，在 20 世纪 40 年代早期就被发现对麻风分枝杆菌治疗有效。就像其他叶酸合成的抑制剂一样，二氨二苯砜是抗叶酸制剂，主要作用是抑菌，仅有微弱的杀菌力。常见的不良反应包括恶心、呕吐、厌食和高铁血红蛋白血症，也可出现血尿、皮疹、瘙痒和高热。传统上将二氨二苯砜与 RIF 及氯法齐明联用用于治疗麻风病。二乙酰氨苯砜是双乙酰化的二氨二苯砜，半衰期长达 46 天，故而这种药物被较少使用(例如，每年注射 5 次)，每次用药后 20～35 天就会在组织中达到药物浓度峰值。二乙酰氨苯砜对麻风分枝杆菌作用效果相对较差，在体内该药物会发生去二乙酰化反应，生成母体化合物二氨二苯砜。

(十三)德拉马尼(delamanid)

德拉马尼一种被用于治疗 MDR 结核病的硝基二氢咪唑并噁唑衍生物[56-57]。由于德拉马

尼具有较低的肝毒性，以及与抗逆转录病毒药物较低的相互作用，因此在治疗 MDR 结核病方面，该药比 BDQ 更具优势。德拉马尼对于治疗先前已接受过 BDQ 或氯法齐明给药的患者可能更加有效。

(十四)乙硫异烟胺(ethionamide，ETH)

ETH 是异烟酸衍生物，它与 INH 一样能阻断分枝菌酸的合成。对高浓度 INH 耐药的 MTBC 菌株却对 ETH 敏感，这表明两种药物对 MTBC 细胞壁作用部位不同。目前已发现 *inhA* 启动子区的突变与 ETH 耐药相关[18]。ETH 用药不良反应包括胃肠道刺激和神经症状。

(十五)大环内酯类药物(macrolides)

阿奇霉素和克拉霉素是治疗 MAC 疾病最重要的药物，在 HIV 阳性患者中，这两种药物被批准为预防用药以阻止 MAC 病的传播，效果明显[58-59]。这些药对于海分枝杆菌、嗜血分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、猿猴分枝杆菌和其他几种/亚种 RGM 感染的治疗也是有效的。事实上，它们被看作是治疗 NTM 感染的潜在基础药物[9-10]。阿奇霉素(叠氮化合物，大环内酯的一个亚类)和克拉霉素与红霉素结构类似但却又有所修饰以改善它们的酸稳定性，进而提高药效、半衰期、组织药物浓度和生物利用度而不引起毒性。这些大环内酯类药物通过与原核态的核糖体 50S 亚基结合，阻断肽基转移酶活性，干扰蛋白质的合成，进而抑制微生物的生长。Meier 等[61]发现对克拉霉素和阿奇霉素双耐药的胞内分枝杆菌在 23S rRNA 编码基因的第 2058 位的腺嘌呤处发生单碱基突变。在其他菌中该位点的突变或甲基化修饰与大环内酯类药物的耐药性有关。在龟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌中也发现了同样的大环内酯类药物耐药的遗传基础[62]。在其他几种 RGM 中发现的另外一种耐药机制是由于 *erm* 存在而产生的诱导性耐药，这将在本章后续进行讨论。

在动物实验研究和临床使用中表现出来的治疗效力主要是基于阿奇霉素在组织中浓集的能力[14-63]。在多形核中性粒细胞中，该药物浓度比在血清中高约 1000 倍[64]。与此类似，克拉霉素在组织中的浓度比在血清中高 4～5 倍，在巨噬细胞中的浓度则比在血清中的高 20～30 倍。

(十六)对氨基水杨酸(*p*-aminosalicylic acid，PAS)

PAS 酸是一种对 MTBC 有效的抗叶酸制剂，但是它对其他分枝杆菌却无效。有证据表明 PAS 也可影响 MTBC 对铁的转运和水杨酸代谢。在胃肠道中 PAS 不能被完全吸收并且它可能会引发严重的胃肠道不良反应。

(十七)喹诺酮类

左氧氟沙星(levofloxacin，LEV)和莫西沙星(moxifloxacin，MOX)是氟化羧基喹诺酮类药物，并对完全敏感和耐药的 MTBC 及许多 NTM 具有良好体外抗菌活性[65-66]。MOX 用于治疗多重耐药结核病时特别有效[67]。据观察结果显示氟喹诺酮类药物在肺组织中的浓度至少比血清中高 4 倍以上。

所有氟喹诺酮类药物的作用机制是通过与 DNA 促旋酶(拓扑异构酶类，Ⅱ型)结合进而抑制 DNA 合成[68]。Takiff 等[69]曾报道 MTBC 对喹诺酮类耐药与编码促旋酶亚基的 *gyrA* 和 *gyrB* 基因突变有关。在 MTBC 中，氟喹诺酮类药物通过结合细菌的酶-DNA 复合物发挥作用，可能的机制有链断裂、SOS 介导的自溶及复制阻滞等。虽然没有喹诺酮类和其他抗分枝杆菌药物之间交叉耐药的报道，但存在喹诺酮类药物之间交叉耐药的报道，如对某一种喹诺酮类药物的敏感性下降可能导致所有的喹诺酮类药物的疗效降低[66]。尽管对 LEV 耐药，但含有 *gyrA* 突变的结核分枝杆菌菌株对采用 MOX 的治疗会有所响应[70]。氟喹诺酮类的不良反应可能没有其他二线药物那么严重[71]。

(十八)抗结核新药

有希望将包括硝基咪唑类和恶唑烷酮类药物在内的几类新药物用于泛敏感及耐药结核分枝杆菌感染的治疗。这些新药物具有新的作用机制，并且与现有抗结核药物之间无交叉耐药。其中的一些相比目前使用的药物表现出更强的杀菌效果同时可以缩短治疗时间。而且在治疗 HIV 和 MTB 共感染时，这些新药似乎与蛋白酶抑制剂的相互作用更小。这些潜在的优势有待临床试验地进一步证实。在撰写本章时，笔者尚未获得有关

这些药物的药敏试验信息。

硝基咪唑类药物 PA-824（pretomanid）与 MOX 和 PZA 联用的临床试验现在正处于Ⅱb 期。研究表明这一疗法安全，耐受性好，并且在用药 8 周内就表现出很好的杀菌活性[72]。PA-824 与 BDQ 和利奈唑胺（linezolid，LZD）联用的临床试验目前正处于Ⅲ期，恶唑烷酮类药物利奈唑胺已被证实对包括多耐药结核病在内的结核病的治疗有效[73-74]。然而，该药的价格及包括神经病变和贫血在内的不良反应的高发生率限制了它的使用。替代剂量治疗方案可能有助于缩短疗程。

(十九)用于药敏试验的药物

用于药敏试验的抗菌药物（参考粉剂）可以直接从制造商或商业途径获得。在美国，大部分抗菌药物也可从美国药典委员会所属公司的参考品订购部门购买。参考粉剂应带有试验效价（每毫克多少微克）、有效日期、批号、贮存条件及该粉剂的稳定性和溶解试剂等相关信息。用于人和动物治疗的配方不能用于药敏试验。未开封的参考药物粉剂的小瓶应按照制造商的要求保存，开封后的小瓶要在合适温度下保存在干燥容器中。大多数浓度在 1000 μg/ml 或更高浓度药物的贮存液在 −20℃可至少稳定保存 6 个月，在 −80℃～−70℃可稳定保存 1 年。除了遵守一般建议外，还应遵守药物制造商的建议。通过商业途径可获得含有标准量的一线和二线抗结核药物纸片，这些纸片可用于比例法药敏试验。因为这些纸片标有药物名称和浓度，所以使用这些纸片可以避免称量、稀释和标记的错误。这项技术提供的结果可以等同于用参考粉剂制成的溶液获得的结果。每个新批号的抗菌药物都应进行质量控制（quality control，QC）检测。

二、MTBC 的药物敏感性试验

(一)药物耐药性

在 20 世纪 60 年代早期，WHO 组织了 2 次会议以制定检测 MTBC 对抗结核药物耐药性的可靠标准和技术[75-76]。不同药物在罗氏斜面培养基耐药的临界比例（与治疗失败相关的耐药细菌的比例）不同，如 INH 和 RIF 为 1%，而 STR、EMB、PZA、ETH、KAN 和 CS 为 10%。然而，基于 7H10 琼脂检测的经验[77]，美国疾病预防和控制中心（Centers for Disease Control and Prevention，CDC）推荐使用 7H10 琼脂和 1%作为所有药物的临界比例[78]。

耐药性从根本上来讲就是一种与初始细菌量较大相关联的现象。在肺结核中，最大的细菌群落出现在空洞的优势群落中，含有 10^7～10^9 细菌量。而在最常见的病变类型如硬干酪样灶中发现的细菌群体一般不超过 10^2～10^4[79]。早在 1949 年，人们就发现在治疗空洞型肺结核期间耐药性发生的频率较高[80-81]。David 等证实了药物耐药突变的概率分布和变异反应试验，他们的结果表明 MTB 通过自发突变导致对 INH、STR、EMB 和 RIF 耐药。0.2 μg/ml 的 INH、2.0 μg/ml 的 STR、5.0 μg/ml 的 EMB 和 1.0 μg/ml 的 RIF 的最高突变频率分别为 3.5×10^{-6}、3.8×10^{-6}、0.5×10^{-4} 和 3.1×10^{-8}。因此，INH 和 RIF 耐药的突变频率约为 10^{-13}。所有有关 MTB 抗菌药物耐药性遗传基础的研究提示，多重耐药结核分枝杆菌表型是累积突变的结果而不是获得多重耐药转移因子[24]。

(二)影响药敏试验的 MTB 特征

根据普遍接受的理论，药物治疗期间产生的耐药性是由于存在于宿主体内的结核分枝杆菌群体中的耐药突变株被筛选并增殖所致。由于菌群中绝大多数是敏感株，治疗初始会杀死大量敏感菌。因此，在治疗的初始阶段细菌数量急剧下降。而耐药突变株的增殖会导致后续细菌数量上升。这种如在患者痰中所出现的“下降和上升”现象早在 20 世纪 40 年代末就已被报道[83-84]。

1979 年，Mitchison[85]建议用“特殊群体”假说来解释主要抗结核药物对结核分枝杆菌不同亚群的作用。这些亚群包括：①肺病变部位快速生长的杆菌；②短期生长代谢加速及可能对利福平而不是异烟肼敏感的杆菌；③存在于酸性环境干酪样病变中的杆菌；④休眠的、非复制状态的杆菌。已有假说部分解释了抗结核药物早期和晚期杀菌活性的机制。传统的多种药物治疗方案能成功治疗结核病的原因之一是每种药物在清除这些特殊群体中的个体时发挥独特的作用。因此，使用多种药物治疗结核病旨在防止药物耐药和达到最大的治疗效果。具有不同代谢状态的亚群的存在也

意味着传统的药物代谢动力学研究不能预测结核病治疗方案的有效性[86]。

(三)临界浓度

耐药 MTBC 的界定标准是建立在经验的基础上,即存在高于某个比例的耐药突变株且治疗难以成功。建立药敏试验程序和结果解释标准需要考虑 2 个因素:①耐药突变株的临界比例;②培养基中药物的临界浓度。基于临床和细菌学研究,耐药细菌的比例通常设定在 1%,高于此比例则不可能有临床反应。药物的临界浓度是指能抑制大部分结核分枝杆菌野生株生长而对可能存在的耐药突变株生长无明显影响的浓度。换言之,如果结核分枝杆菌对某种药物临界浓度耐药的比例超过 1%,那么使用这种药物治疗就不可能成功。需要注意的是,这个浓度可能与血清中药物的峰浓度没有直接关系。表 78-2 列举了在不同的培养基中各种抗结核药物的临界浓度[11,87-91]。

表 78-2 用于治疗 MTBC 的抗菌药物试验浓度

抗菌药物[f]	培养基和浓度(μg/ml)[a]			
	液体系统		琼脂比例法	
	MGIT960	VersaTrek	7H10	7H11
一线药物				
RIF[b]	1	1	1	1
INH[c]	0.1	0.1	0.2	0.2
PZA	100	300	NR[d]	NR[d]
EMB	5	5	5	7.5
二线药物				
高浓度 INH[e]	0.4	0.4	1	1
AMK	1		4	
CAP	2.5		10	10
ETH	5		5	10
KAN	2.5		5	6
左氧氟沙星	1.5		1	
莫西沙星	0.25		0.5	0.5
PAS	4		2	8
RFB	0.5		0.5	0.5
STR[e]	1,4		2	2

注:[a] 表中的浓度来自参考文献[11]。[b] 大约 30%的 RIF 耐药株对利福布丁敏感。[c] INH 应首先检测临其界浓度时的耐药情况。当结果为耐药时,检测更高浓度的 INH 和其他二线药物。[d] NR. 不推荐。[e] 实验室可仅检测较低浓度。[f] RIF. 利福平;INH. 异烟肼;PZA. 吡嗪酰胺;EMB. 乙胺丁醇;PAS. 对氨基水杨酸

(四)低浓度与高浓度药物的比较

有时琼脂比例法或商品化肉汤系统可能提示 MTBC 分离株在临界浓度对 INH 耐药。当这种情况发生时,尽管没有关于更高浓度结果与临床相关性的共识,但还是建议再次检测相应药物更高的浓度[11]。

对 INH 的低水平耐药提示可能同时对 ETH 耐药[18]。另外,当某分离株对低浓度 INH 耐药但是对高浓度 INH 敏感时,调整 INH 剂量可能有效。CLSI 建议在结果中附加以下注释:"这些检测结果提示对 INH 低水平耐药。关于合适的治疗方案和剂量应咨询耐药结核病治疗专家。"

(五)转诊服务

尽管在美国和一些其他工业化国家结核病的发生率正在减少,但移民来源国的耐药结核病的发生率正在增加。随着新的快速分子技术的应用,在分枝杆菌实验室中需要进行药敏试验的患者培养物或标本数量可能会减少。由于这些情况在不断变化因而可能需要复审哪些实验室应该进行药敏试验。由于测试标本量不够而不能维持专

业技能或成本效益的实验室和不能利用新的、更快速的技术的实验室应该考虑将标本或培养物送至参考实验室进行检测。参考实验室使用快速检测技术可以弥补把培养物转运到参考实验室所浪费的时间。美国国家公共卫生实验室和CDC具备检测能力及专业能力来进行结核病病原菌DST检测。当某处不具备DST检测能力时，公共卫生实验室有专门共享的结核病DST检测网络，这其中包括快速分子检测法。

(六)什么时候进行药物敏感性试验

美国CDC和CLSI指南建议对每位患者体内首次分离的MTBC菌株都需要进行一线药物的敏感性试验[11,92]。这保证了患者得到最有效的治疗，同时也能获得对结核病控制的监测数据。如果治疗3个月后培养不能转为阴性或者有临床证据表明治疗失败，则需要重复药敏试验。如果一个实验室不能提供这项服务，那么应该将分离株转运到另一个实验室及时进行检测。

当检测到对利福平或者任何2种一线药物耐药时，应该进行二线药物的敏感性试验。另外，当某分离株显示对临界浓度的异烟肼单独耐药且临床医生正计划往治疗方案中加入氟喹诺酮类药物，那么也应该进行二线药物的DST检测[11]。

(七)什么时候报告耐药结果

药物敏感性结果应尽快报告。当检测到药物耐药并且证实这种耐药不是由于污染或者混入了NTM所导致时，需发送一份书面报告并立即告知主治医生。如果需要进行重复试验来验证药物耐药，则应尽快发送一份初步报告提示已检测到耐药性并告知重复试验正在进行中，同时也要把这一情况告知医生。一旦初步判断的耐药性得到验证，那么应再签发一份最终报告。当由于培养物不纯而导致药物敏感性试验延误时，也应该签发一份说明此情况的初步报告。

(八)MTBC的DST检测方法

通常用于检测MTB抗菌药物敏感性试验方法的原理是基于观察在含有某种药物特定浓度的固体或液体培养基中的微生物生长情况。目前为止，已有4种以培养为基础的方法：琼脂比例法、使用商业化肉汤的改良比例法、绝对浓度法和耐药比率法[93-94]。本章仅进一步讨论琼脂比例法和商业化肉汤培养系统，其余2种方法将在别处进行讨论[94]。有2种由美国FDA批准的自动化且非放射的肉汤培养系统：MGIT960系统（Becton Dickinson）[95-96]和VersaTREK分枝杆菌检测和敏感性试验系统（Thermo Scientific）。VersaTREK也开发了一种最低抑菌浓度微孔板法。基于CLSI的指南[11]，在实验室收到标本的28天内应该同时使用快速肉汤敏感性试验和快速培养和鉴定以提供DST试验结果[92]。在使用任何快速肉汤系统之前，都应使用标准化的方法来进行验证。

(九)琼脂比例法

用于MTBC DST检测的琼脂比例法是由G. Canetti于20世纪60年代早期研发[75-76]。该方法随后被改良和标准化。多年来，美国和欧洲许多国家把该方法作为MTBC对除PZA外所有药物敏感性试验的标准方法。琼脂比例法不适合检测PZA，因为当培养基的pH被调至5.5时，常常不利于MTB的生长。首选的培养基是7H10琼脂。药物可以由参考粉末配制（琼脂扩散），也可以加入浸有药物的纸片（纸片洗脱）[87]。

1. 培养基 为了保证琼脂比例法检测MTBC药敏结果一致，推荐使用含有油酸甘油酯-白蛋白-右旋糖-触酶（oleic acid-albumin-dextrose-catalase，OADC）的7H10琼脂作为标准培养基[11,87]。大部分MTBC临床分离株都能在这种培养基上生长，且7H10琼脂的透明度使得在解剖显微镜下能够识别混合分枝杆菌生长情况及观察是否发生污染。某些情况下，由于7H10培养基上耐药菌株生长不充分可能会使DST结果无效。为了检测那些分离株，可以使用7H11培养基代替7H10培养基，表78-2列出了应该使用更高浓度的部分药物[97]。培养基的质量控制尤其是OADC的添加至关重要。

2. 接种和孵育 用琼脂比例法进行DST的接种物来源可以是肉汤（间接法）或固体培养基的原代或传代培养物，或者是涂片抗酸阳性的标本（直接法）。其总的孵育时间为3周。

间接法的接种物来源通常是来自初次分离培养基的纯培养物。应仔细选取菌落类型，使最终接种物可以代表所有存在的菌落类型从而保证潜

在的耐药和敏感菌之间的平衡。必须选择足够数量的菌落使菌悬液的浊度达到1个麦氏单位。如果没有足够的生长物，应在35～37℃下，在杜布斯吐温白蛋白培养液或7H9肉汤中进行传代培养直到浊度达到1个麦氏单位。菌悬液中不应含有细菌团块。在稀释过程中，不同的菌悬液每毫升中所含的实际菌落形成单位(CFU)可能不同，所以必须用2个稀释度的菌悬液(通常为10^{-2}和10^{-4})接种到2套培养基中。如果生长不充分，可以使用稀释度为10^{-1}和10^{-3}的菌悬液，或者在肉汤中对分离株进行传代培养以获得足够量的生长物。来自商业化检测系统的阳性肉汤培养物也可以用于制备细菌悬液。

用于直接法的接种物可以是经消化的、去污染的临床标本，也可以是未处理的、常规无菌体液，这些标本涂片染色均存在抗酸杆菌。为了保证细菌在直接敏感性试验中足够但非过度生长，应根据涂片染色时观察到的细菌量稀释标本。表78-3列出了典型的稀释方案。理论上，这种类型的接种物更能代表宿主特定病变中的结核分枝杆菌群体。如果涂片阳性的标本来自于正在接受抗菌药物治疗的患者，那么在涂片上看到的很大一部分杆菌可能无法存活，应谨慎使用这种未稀释的接种物。直接敏感性试验有2个主要优点。首先，实验室在标本接收的3周内能报告大部分涂片阳性标本的DST结果；其次，耐药细菌的比例能更好地代表患者体内的细菌群体。怀疑存在耐药MTB时或在耐药MTB高流行地区可以使用直接法。然而，当涂片阳性标本中NTM存

表78-3 直接法药敏试验7H10培养基接种之前浓缩标本稀释度的选择指南

试验稀释倍数[a]	抗酸杆菌数量/镜下视野观察范围		
	石炭酸品红染色[b]	荧光染色	WHO报告
未稀释，10^{-2}	<1	<5	2+
10^{-1}，10^{-3}	1～10	25～250	3+
10^{-2}，10^{-4}	>10	>250	4+

注：[a] 根据在原始抗酸涂片中观察到的杆菌数量来准备浓缩标本的稀释倍数。使用无菌去离子水来稀释样本；石炭酸品红染色使用油镜(1000×)观察，荧光染色使用高度干燥物镜(450×)观察。如果患者正在接受治疗，涂片中观察到的杆菌并非均存活，因此，应该同时检测未稀释标本和基于本表所列标准适当稀释的标本。[b] 来自参考文献[87]

在的概率较高时，检测费用会成为一个关键的考量因素。同样，由于无法准确地校准接种物，细菌在无药物象限内可能生长不足或过度生长，进而导致测试无效。另外，如果污染物生长，那么结果是不能判断的。直接法DST的失败率可能达到15%或更高，此时就需要使用间接方法进行重新检测。

象限平板通常用于琼脂比例法，将不同稀释度的0.1 ml接种物(相当于巴斯德吸管3滴)接种至每个象限内，每组平板使用一个稀释度。随后在生物安全柜中将平板彻底晾干。平板晾干后，将其放置在可渗透二氧化碳的聚乙烯袋中(透明夹层袋)或使用可渗透二氧化碳的胶带逐个密封。将平板放置于含5%～10%的二氧化碳的空气中，在35～37℃下孵育。期间必须避光以防止培养基中的成分转变为甲醛。更佳的做法是孵育1周后检查含药物的平板是否存在污染物。若有污染，应该使用纯分离株重新进行敏感性试验。

3. 判读和解释结果 MTBC耐药的标准基于以下：当针对一种药物耐药突变株的比例超过1%时，该药物实际上就没有足够的治疗效果[76]。在比例法中，耐药百分比是通过计算在含有药物象限内的菌落数除以对照象限内的菌落数获得的。当耐药百分比大于1%时，认为该分离株对该药物耐药。

为了保证检测的有效性，低稀释度的对照象限内应至少有50个菌落。如果3周后低稀释度(10^{-2}或10^{-1})的对照象限内少于50个菌落，则提示生长不足，这就表明该检测无效并应该重新进行测试。总的孵育时间为3周。然而，如果3周之内对照象限出现成熟菌落即可报告耐药结果，而敏感结果需到3周后才可报告。如果培养物孵育时间超过3周，可能会由于抗菌药物的降解而导致假耐药结果。

应该在肉眼和显微镜下仔细检查MTBC的菌落形态、色素沉着以排除NTM或其他微生物的存在。当使用直接法进行敏感性试验时该步骤就显得尤为重要。就MAC分离株而言，在7H10培养基上出现的快速生长的小菌落及粗糙、干燥菌落，其形态可能与MTBC的菌落相似。同样，RGM菌株可以在初次分离培养基上缓慢生长，当测试一线抗结核药物的耐药性时，这些菌株将出

现与多重耐药MTB一样的结果。在没有对微生物进行初步鉴定的情况下，绝不能报告直接法的敏感性试验结果。

使用琼脂比例法，特别是检测EMB时，可以观察到微小菌落。微小菌落的存在以下几个可能：敏感的微生物在降解的药物中生长、真正的耐药或部分耐药。微小菌落的意义仍然未知，因而每个实验室应根据自己实验室的经验决定最佳报告方式。随着分子生物学技术的发展，检测药物耐药相关突变可以帮助区分真正的耐药和由于药物降解所导致的敏感菌的生长。

4. 质量控制 推荐采用对所有一线和二线抗结核药物均敏感的MTB参考菌株H37Rv(ATCC 27294)用于DST检测的质量控制。耐INH、RIF和(或)其他药物的MTB可以从美国标准培养物收藏中心(American Type Culture Collection，ATCC)获得。然而，对高浓度药物耐药的菌株不适合用于质量控制。理想的情况是选择对某一特定药物的耐药、处在或者接近临界值的某株MTBC菌株进行质量控制。用于性能评估程序模型的许多菌株都具有这些特性。此外，出于安全性考虑，不建议使用对2种及以上药物耐药的MTBC菌株。用7H9肉汤调制的1.0个麦氏单位MTB质控菌株的等分菌悬液在−70℃下能储存6个月。所有组分包括每一批次新的培养基或抗菌药物均应进行质控，培养基应进行无菌性及生长适宜性的核查。

(十)用于DST的MGIT 960系统

1995年，MGIT系统被用于临床标本中分枝杆菌的生长和检测。每只试管里含有改良的7H9肉汤，管底是基于荧光淬灭的氧传感器(五水合钌浸没的硅橡胶)。当生长活跃的病原体利用溶解的氧时，减少的氧浓度能激发荧光，通过进一步测量荧光的产生量并以生长单位(growth unit，GU)为单位来表示细菌生长。MGIT 960系统是一种通过每小时检测荧光信号来连续监测微生物生长的全自动系统。该系统使用非放射性的培养基，且不需要使用进样针来添加生长补充物或接种微生物。2002年，该系统被美国FDA批准用于MTBC对STR、INH、RIF、EMB(取首字母，即SIRE)和PZA的DST检测。EMB和PZA的检测试剂单独销售，因其使用不同培养基，需要单独设置对照。目前，虽然STR被认为是二线抗结核药物而并不包含在一线抗结核DST检测药物中，但EMB(SIRE)试剂依旧包含这些组分。多项研究表明，与采用放射性试剂的BACTEC 460系统(已经不再销售)和琼脂比例法相比，MGIT 960系统用于一线药物DST检测的性能与前两者是相同的，获得结果的时间与460系统相当[95,98-102]。

MGIT SIRE试剂盒含有冻干的INH、RIF、EMB和STR，以及补充物的药物，专门为MGIT 960系统针对这4种药物的DST而设计。一线DST的具体设置包括INH、RIF、EMB和PZA。PZA是单独检测，这个在后文将会被讨论。笔者鼓励那些仍旧在一线DST中纳入STR(已划归为二线抗结核药)的实验室或临床医生在其结核病防控程序中将STR剔除，仅当需要时再开展。MGIT 960系统使用双重检测过程。当被检菌对低浓度药物耐药时，需要提高药物浓度再来检测。然而，这是可选步骤，临床实验室可能会根据自身的结核病防控规章或临床医生的意见来设置自身的策略进行检测。尽管MGIT 960系统进行二线药物的DST不被美国FDA批准，但之前的几项研究已证实该系统能够检测MTBC，包括MDR菌株对几种二线药物的敏感性[89,91,99,103]。

1. 接种物和孵育 MGIT 960 DST系统的接种物可以从固体或者MGIT960液体培养基获得。在考虑进行DST前，必须对阳性培养物中MTBC的菌株进行鉴定。产品说明书中的DST流程和时间安排是基于上述过程已经准备好的情况下设计的。在临床实验室中，当MGIT 960系统的培养管报阳时，通过抗酸染色和其他鉴定过程可排除一些阳性结果。当MTBC被鉴定出后，才尝试做DST。整个工作过程需要1～7天来完成。这个时间长短取决于实验室工作流程上的策略。当MTBC被鉴定出后，初次培养的菌量(在报阳并且进一步孵育后)与所谓的第0天(即报阳的当天)是不同的。为了继续试验，获得第0天的生长量，须另接种一根MGIT培养管，直到它报阳(这一步很重要，因为第0天是参考点，这个时间与试剂商的时间表吻合，可确保用合适菌量进行DST)。用于接种的合适菌量为0.5 ml 1∶100稀释的细菌悬液(相当于0.5个标准麦氏浊度)。接种后，MGIT培养管应在孵育后4～9天内报阳(这是作者与

BD公司私下交流获得的信息)。如果报阳时间短于4天,那么原因要么是接种量过大,要么是培养物不纯。

一套试剂盒包括一支生长对照管(不含药物)及含药物的试管。接种前的准备工作包括在每个管内加入0.8 ml SIRE添加剂及0.1 ml药液。已接种过的MGIT培养管在报阳(第0天)后,需要再孵育1～2天,期间需要准备DST事宜。培养管内容物必须充分混匀,随后用于DST。

生长对照管内接种的是1∶100稀释的受试菌液。接种量为0.5 ml。如果不能在报阳后1～2天内开展DST,那么可以在报阳3～5天内将菌液进行1∶5稀释再用于DST。5天后,MGIT阳性管中的菌量会由于太多而不适用于DST。这期间须接种一新的培养管并孵育,这一管可以按照如前所述的试剂生产商的时间表进行DST。

固体培养基的生长物同样可以用于DST的接种。分离株培养时间不得超过形成菌落后14天。为了确保能获得不同的菌群,应该从培养基的不同部位挑取培养物,接种入7H9肉汤培养基或无菌生理盐水中。将细菌悬液调成0.5个标准麦氏单位,然后用无菌生理盐水进行1∶5稀释,随后再接种。若进行1∶100稀释,则用于生长对照。

接种后,需在MGIT 960系统中将DST的具体设置登记到合适的含条码的药敏管架上。选择合适的管架与接种的培养管进行匹配非常重要。MGIT 960系统会每小时自动监测培养管的生长情况。

2. 读取和解释结果 当生长对照管的GU在4～13天内达到400时,MGIT 960系统将会报警表明DST已完成。需要基于以下的规则解释药敏检测的结果:当某株细菌在含药管的GU＞100时,认为对该药耐药,当GU≤100时判断为敏感。如果生长对照管的GU在4天内达到400则表明该检测无效,提示细菌生长过快(可能的原因为接种量太大或存在污染);生长对照管的GU达到400的时间＞13天也表明检测无效,提示细菌生长过慢。

当DST完成时,MGIT 960系统允许用户打印结果报告单。核对结果报告单上的药物顺序和上机的药物管顺序很重要,尤其是报告耐药结果时。在签发初步报告之前,通过排除由NTM或其他细菌引起的明显耐药从而证实任何耐药结果是非常关键的。以下步骤有助于证实耐药结果的可靠性。首先,检查得出耐药结果的培养管的浊度。MTBC通常在试管的底部以小的团块生长,而肉汤通常保持澄清状态。如果在摇晃管之前肉汤就已出现浑浊,则可能存在NTM或其他细菌。其次,从管中吸取标本进行涂片并进行抗酸染色,从形态学方面验证为MTBC而不是NTM和其他细菌。MTBC通常呈索状或捆状排列。尽管抗结核药物可能改变其典型的捆状排列,但是整个涂片上见到散在分布的抗酸杆菌或随机的松散团块提示可能存在NTM。少数情况下,当难以区分MTBC和NTM时,建议对显示耐药的培养物用7H10或7H11进行传代培养。数天后用显微镜观察菌落形态有助于区分MTBC和其他分枝杆菌。

当对任何从MGIT 960系统得到的DST结果有疑问时,使用分子生物学方法(第32章)有助于及时确认耐药表型。如果不能及时开展分子检测,应使用琼脂比例法或者MGIT 960系统再次测试。如果培养物中含有非抗酸杆菌或NTM,那么在尝试重新检测前必须获得MTBC的纯培养物。由于重新分离MTBC可能需要几周时间,所以可以考虑用分子生物学方法检测耐药突变位点。为了验证初次耐药结果是否有必要进行重新测试,每个实验室应当制定出自己的方案。当实验室第一次使用MGIT 960系统或者是微生物学家被首次培训使用该系统时,应记录重新测试结果的重复性,这是保证质量的一个很好的办法。此外,分子生物学方法有助于确认一些罕见耐药表型(例如,仅对RIF耐药或仅对EMB耐药),特别是当检测耐药相关的突变时。然而,若耐药相关突变检测不到,也不能排除耐药,此时可考虑用培养法重新进行DST。

3. 质量控制 将对所有一线药物均敏感的MTB参考株如H37Rv(ATCC 27294)用于对每一批次药物试剂盒和培养基的检测。在每次测试时应同时检测参考菌株,或者当每周进行多次测试时应每周检测1次参考菌株[11]。因为这是产品说明书中所包含的满足当前CLIA要求的QC操作方案。

4. PZA检测 2002年,商品化的MGIT 960系统被开始用于PZA药敏试验。该系统PZA药

敏试验使用的平台与前面介绍的一致但有以下不同点：①MGIT PZA测试管pH较低；②PZA药物试剂盒含有PZA和PZA补充物，且该补充物不能与SIRE试剂盒的补充物互用；③PZA生长对照管中的接种物是将管中培养物按1∶10稀释后得到的。接种之前需要做的准备工作包括把0.8 ml PZA补充物加入到生长对照管和PZA药物管中，以及加0.1 ml PZA溶液到PZA管中。来自阳性管或固体培养基的接种物的准备与SIRE药敏试验相同。结果解释标准也与SIRE药敏试验相同。

用于验证MGIT 960系统SIRE耐药结果的程序同样适用于PZA药敏试验。由于MTB很少对PZA单独耐药，所以对PZA初次耐药的结果应重新进行测试，并进一步鉴定细菌到种的水平（如MTB和牛分枝杆菌）。

PZA DST的重复性似乎比其他一线药物差[104-105]。接种物的准备至关重要。与0.5 ml的标准接种量相比，0.25 ml的接种量可以减少假耐药结果[106]。结合以培养为基础的药敏检测和*pncA*测序可以对PZA敏感或耐药提供最可靠和准确的预测[107]。

（十一）VersaTREK

VersaTREK是一种全自动的连续监测系统，用于MTB的生长和检测及针对MTBC对所有一线药物的敏感性检测。VersaTREK技术原理基于密闭瓶内肉汤顶部空间的压力改变（由于微生物的生长导致的氧消耗）的检测。培养基由富含生长添加剂（甘油和酪胨）的7H9肉汤组成，并且含有能增加暴露于氧气的表面积和作为生长基质的纤维素海绵。

1. 接种物和孵育 VersaTREK有用于检测INH、RIF和EMB的药敏试剂盒和用于检测PZA的试剂盒，均被美国FDA认可用于诊断用途。这些药物试剂盒包括冻干的药物粉末和稀释液。其工作液是由25 ml稀释液溶解药物干粉制备而成。DST测试瓶的准备工作包括用注射器往瓶内加入1.0 ml生长补充物和0.5 ml抗菌药物工作液。瓶内的终浓度如下：INH为0.1 μg/ml，RIF为1.0 μg/ml，EMB为5.0 μg/ml。如果有需要或者提示检测2种水平的药物浓度，INH和EMB可以进行更高浓度的测试（分别是0.4 μg/ml和8.0 μg/ml）。PZA的终浓度是300 μg/ml。接种物可以来自固体培养基（如罗氏培养基或7H10/7H11培养基）或者液体培养基（如VersaTREK Myco培养基或7H9培养基）。细菌悬液的浊度调节至1.0个标准麦氏浊度单位，把10倍稀释后的菌悬液接种于含药瓶和对照瓶内，接种量为0.5 ml。孵育温度为35℃。仪器每24 min自动监测瓶内的生长情况。

2. 结果读取和解释 DST结果是人工读取的。当对照瓶（不含药物）在接种后的3～10天以内检测到生长则表明该DST结果有效。对照瓶变为阳性后含药瓶需继续监测3天。如果含药瓶检测到有生长的时间是在生长对照瓶变为阳性后的3天或3天以内，则该分离株被判断为耐药株。当含药瓶没有检测到细菌生长或者检测到细菌生长的时间是在对照瓶变为阳性的3天以后，则该分离株被判断为敏感株。少数研究表明，VersaTREK Myco系统、BACTEC 460系统、MGIT 960系统和琼脂比例法具有较好的一致性。VersaTREK Myco系统检测耗时完全能与BACTEC 460系统和MGIT 960系统相比[108-110]。

3. 质量控制 每一批新的VersaTREK Myco试剂盒、VersaTREK Myco PZA试剂盒、Myco培养瓶和生长添加剂都应该选用合适的MTBC质控菌株进行质检。每次检测应包括泛敏感的MTBC菌株[11]。

（十二）其他可选择的DST方法

分枝杆菌的DST领域自2000年以来逐渐变得活跃并产生了许多成功用于临床实验室的新技术。一些新技术基于检测生长抑制的改进方法，而另一些则基于耐药相关突变的分子检测[111-119]。

1. TREK Sensititre MYCOTB MIC微孔板法 这种方法使用96孔板，其孔内微量肉汤中含有稀释的药物，可用于检测一线和二线药物的药敏情况。该方法还未被美国FDA批准用于诊断，因此，目前仅限于科研使用。与其他处理MTB活菌的程序一样，当使用微孔板进行DST时，一定要严格遵守生物安全规定。Sensititre MYCOTB MIC微量稀释板包含冻干的抗生素，包括AMK、CS、EMB、ETH、INH、KAN、MOX、OFX、PAS、RFB、RIF和STR。尽管在本文出版时CS已被纳入到这一检测系统，但其结果与作为参考的琼脂比例法的结果不匹配[120]，故此不能报告CS的药敏结果。

在测试开始后10～21天内即可获得结果。该药物敏感性试验需要使用来自于固体培养基的菌体制备接种物，此要求可能导致检测的延误。与琼脂比例法相比，该方法性能优异，符合要求。某研究表明就EMB、MOX和CS而言，2种方法一致性为94%～100%；另一研究得到的一致性则较低，为80%～99%[120-121]。对于重要的一、二线药物，MYCOTB MIC微孔法结果以MGIT 960系统作参照时的准确度>90%[122]。

由于PZA的检测需要酸性环境，所以MYCOTB MIC微孔板法的主要缺点是不能检测PZA，因而有必要使用其他方法检测PZA的敏感性。此外，该系统也不能检测CAP和MDR结核菌株的耐药性。由于二线药物耐药率为10%，即90%分离株是泛敏感的，所以对所有分离株进行二线药物敏感性试验既没必要也不经济。然而，这个系统有它潜在的优势。获得的MIC值可以为琼脂比例法和MGIT法由于值靠近临界浓度而导致的低重复性提供一个解释。而且，它还可以通过发现治疗过程中的值升高从而及时确定耐药的产生。尽管该系统代表一种新的MTBC DST检测方法，但MIC值读取的客观性和重复性、不同药物与琼脂比例法一致性的变化、成本效益、治疗结核病患者方案制定中方法的实用性等问题均需要进一步研究。

2. 药物敏感性的显微镜观察 药物敏感性的显微镜观察(MODS)系统是一种基于培养的DST方法。与前面提到的肉汤培养系统不同，MODS不需要从单一途径购买专用培养基。而是可以在24孔微孔板中添加7H9肉汤培养基、OADC和一种选择性的抗生素或抗真菌药物。与Moore等[7]阐述的相同，12个孔中包括4个不含抗结核药物的对照孔和8个分别含有INH、RIF、EMB和STR这4种药物高、低2个浓度的孔。通过倒置显微镜观察每个孔读取药物敏感性的结果。如出现粗糙团块则提示有MTBC生长。该方法能够快速检测MTBC的生长并提示对一线药物的敏感或耐药情况。由于不需要专用的培养基，各种成分可以从不同厂家购买，所以该方法的价格也相对便宜。考虑到使用24孔微孔板的安全问题，应强调把微量板放入封口的塑料袋中进行操作，并且在不打开袋子的情况下透过袋子进行显微镜观察。培养5天后成堆或成团的出现无色素生长物可以初步确定为MTBC，在MTBC高流行地区这一点更为显著。然而，MODS需要满足一些可能在条件有限的地方较难达到的要求，其中包括不稳定成分的获得和储存，如OADC。此外，它需要先进的设施和设备，包括满足三级生物安全的实验室、高速离心机、培养箱和倒置显微镜等。

3. 基于氧化还原比色(还原/氧化)的DST法 这些方法利用氧化还原指示剂来检测固体或液体培养基中的细菌生长情况。与MGIT 960系统(或手工法)相比，在液体培养基中使用该方法可以使结果出现的时间最佳。在没有MGIT 960系统或手工法等资源匮乏的实验室，氧化还原比色法用于进行一线和二线DST不失为一种很好的选择。该方法所使用的培养基和试剂均不需要专门定制，从而可以降低成本[123-125]。

(十三)分子生物学DST方法

多种方法可以用来检测与抗分枝杆菌药物耐药相关的基因突变，这些突变及它们是如何发现的，将会在第32章进行讨论。由于目前对MTBC中耐药相关的突变认识不足，所以分子生物学方法还不能检测到所有的耐药信息。故当资源允许时，还需进行基于培养的DST作为补充。在这种逻辑下，分子生物学方法是现有DST方法的补充，它提高了结核病实验室检测价值。当怀疑耐药表型或易感人群已暴露时，分子生物学药敏检测的使用就会受限。值得重点关注的是，感染了耐药菌株的患者如能迅速得到病原检测结果，则可以改善疗效，缩短感染周期[126]，同时也节省了治疗费用。

三、NTM

一般推荐微量肉汤稀释法作为NTM的药物敏感性试验方法。CLSI提供了MAC、堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌和RGM的药敏试验指南[11]。选择以上将会在下面章节被讨论的分枝杆菌是因为有足够数据作为推荐依据。对于其他生长缓慢的、非苛养的NTM，建议使用与堪萨斯分支杆菌相同的方法和药物。然而，关于敏感性试验结果与临床治疗效果相关性的研究很少。因此，医生在要求对除上述列出的菌种以外的NTM进行敏

感性试验时也应该知晓此类试验的局限性并且要谨慎解释结果。目前无足够的实验数据用于苛养NTM 标准药敏检测的推荐。

只有具有重要临床意义的菌株才应该进行NTM 药敏试验，如从血液、其他无菌体液或组织分离的菌株。然而，对呼吸道分离株临床意义的界定存在争议。这是因为一些 NTM 存在于环境中，并且可以在呼吸道定植，从痰中分离这些细菌并不能说明存在临床疾病。美国胸科学会(the American Thoracic Society)推荐以下微生物标准以辅助诊断 NTM 肺部疾病[9]：①至少从 2 个单独的咳痰样品中获得阳性培养结果(最少应收集 3 个痰标本用于结核分枝杆菌培养)；②至少从一个支气管冲洗或灌洗液标本中得到阳性培养结果；③具有与分枝杆菌感染相符的组织病理学特点的经纤维支气管镜采取的或其他肺活检的标本(肉芽肿或抗酸染色阳性杆菌引起的慢性炎症)和NTM 培养阳性。培养阳性、涂片染色阴性的痰标本不太可能有临床意义。

在接下来的段落中将讨论适用于所有非苛养NTM 的微量肉汤稀释法和质控的一般性建议。与 MAC、堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌和 RGM 相关的具体细节将在相应章节进行讨论。

(一)试验方法

用无菌棉签蘸取固体培养基上生长的菌落或者直接用肉汤培养物制备菌悬液。如果取的是菌落，就将无菌棉签上的细菌转入到含玻璃珠的 4.5 ml 无菌水中(如 7～10 个直径为 3 mm 的玻璃珠)，用比浊仪或目视检测使浊度达到 0.5 麦氏单位。

在涡旋振荡器中激烈振荡混匀菌悬液 15～20 s，然后静置菌悬液使大团块沉淀下来；上清液用作接种菌悬液。

如果使用没有加入肉汤的冻干微量板，最终接种物(细菌量大约为 5×10^5 CFU/ml)应按如下方法准备：对于快速生长的分枝杆菌，将 50 μl 的菌悬液加入到 10 ml 经阳离子调节的肉汤中；对于缓慢生长的 NTM，将 50 μl 的菌悬液加入到 10 ml 含 5% OADC、经阳离子调节的肉汤中。把试管颠倒 8～10 次充分混匀菌悬液。或者，如果使用已加入 100 μl 含有抗菌药物肉汤的微量板，有必要计算加入多少量的标准化的菌悬液到 36 ml 水中进行稀释以使终浓度为 1×10^5～5×10^5 CFU/ml(每个孔含 0.1 ml 的菌液，所含的菌量为 1×10^4～5×10^4)。体积取决于使用的分配系统。

充分混匀最终的接种菌悬液(可以颠倒混匀试管数次或者使用涡旋振荡器)并倒入塑料槽中，然后将 100 μl 菌悬液加入到微量稀释板的每个孔内。每一个已接种的板用黏性封胶进行封盖，在空气环境中进行孵育(当检测大环内酯类药物时，需要避免接触 CO_2)。推荐同时接种一环最终接种物到营养琼脂板上检测纯度，如 5%绵羊血或胰酶大豆琼脂。表 78-4 中列出了每个菌种或菌群的孵育时间和温度。MIC 值指能抑制住菌株生长，从而不能产生可见菌落所需的最低药物浓度(可见的生长可以是菌液浊度增加，或者管底有菌体颗粒沉淀)。MIC 值不适用于甲氧苄啶磺胺甲噁唑。对于这种药物，测试终点是生长抑制程度达约 80%孔(与不含药的对照孔相比)所对应的药物浓度。

表 78-4 非苛养 NTM DST 的推荐温度和孵育时间

NTM 不同种，复合群或群组	孵育		备注
	周期(天)	温度(℃)	
MAC	7～14	36±1	初始检测为第 7 天。若生长不充分，继续孵育并在第 10～14 天再检测
异种分枝杆菌	7～14	36±1，初始	若生长不充分，重做试验，孵育温度设为 42±2℃ 偶尔需要孵育 3～4 周
其他非苛养慢生型 NTM	7～14	36±1	
海分枝杆菌	7	30±2	见克拉霉素 DST 方法部分的详细讨论
RGM	2～5(除克拉霉素外)	30±2	

(二)质量控制

每批次测试板都应进行质量控制，或每周1次质量控制，如果检测频率长于1周，那么应在每次检测时进行质量控制[11]。实验室应检查被CLSI推荐的菌株。目前，用于NTM药敏检测的技术成熟的商品化试剂盒还未面世。因此，除正式的实验室间质量评价系统之外，也鼓励实验室把菌株送往具有丰富经验的参考实验室进行验证。

四、MAC

在许多临床实验室中MAC是最常见的分枝杆菌。从感染HIV的患者血液中分离出MAC尤为重要。尽管由于有效的预防和与高活性抗逆转录病毒治疗相关的免疫系统恢复使得在感染HIV患者中播散型MAC感染发生率显著下降，但在对抗逆转录病毒治疗产生耐药的患者或表现出药物不耐受或依从性差的患者中MAC感染仍然发生。在这些患者中，分离出MAC表明疾病是复发而不是新发感染。MAC也是导致慢性肺部疾病的一个重要原因[9-10]，在美国MAC是肺部NTM感染的主要原因。由于MAC感染而导致肺部疾病的患者通常可归于以下几类人群：具有潜在的肺尖纤维空洞性病变肺部疾病的患者、具有支气管扩张和结节状阴影的绝经后妇女，以及囊性纤维化的患者。

(一)抗菌药物

治疗MAC病的普通疗法列在表78-1中。仅用大环内酯类克拉霉素和阿奇霉素的临床对照试验已证实MAC体外药物敏感性试验结果与临床反应的相关性[128]。由于MAC分离株对克拉霉素和阿奇霉素具有相同的获得性耐药突变机制(23S rRNA编码基因第2058或2059位的腺嘌呤突变，23S rRNA是大环内酯类药物和核糖体结合的假定部位[58-59])，以及阿奇霉素测试存在技术困难，目前CLSI指南指出克拉霉素是MAC分离株唯一应评估其敏感性的药物[11]。Brown-Elliott等[129]的研究表明AMK的MIC值也与其临床响应相一致，这一现象支持将AMK与克拉霉素一起进行DST。在这里有一点需要说明，虽然EMB、RIF和RFB在临床上药效明显，但它们DST结果中的MIC值却不能准确预测临床治疗结局。因为目前缺少实验数据来表明MIC值与这些药物实际临床响应情况之间的关系，用于区分敏感株和耐药株的MIC检测折点值还未确立。因此在进行MAC的DST时，强烈建议不要报告上述3种药物的敏感结果。如果临床上需要使用STR，可对其进行DST。然而，由于研究不够充分，用于区分耐药和敏感结果的折点值还未建立，所以仅报告MIC值而没有对结果的解释。

对大环内酯类药物耐药的MAC分离株及从大环内酯类药物不耐受的患者身上分离到的敏感株的治疗仍存在困难。对这群患者的指导疗法中DST的作用定义不清。这种情况下，即使体内疗效未得到证实，二线的MOX和利奈唑胺的药敏结果仍可报告。对于大环内酯类耐药的MAC分离株的感染，在多药物联用疗法中可考虑氯法齐明。但正如STR一样，氯法齐明的检测折点也未建立，故报告DST结果时只报告MIC值，也没有结果解释。

(二)药敏试验适应证

美国胸科协会建议所有新分离的、未经治疗的、临床上有意义的MAC分离株和分离自使用大环内酯类药物治疗或预防复发患者的MAC分离株都应进行克拉霉素敏感性试验[9]。如果患者临床症状没有得到改善且菌株培养仍然为阳性，那么对于具有播散性疾病的患者，应该在3个月后重复进行DST，而对于患有慢性肺部疾病的患者，应该在6个月后重复进行DST。

(三)试验方法

如上所述，推荐微量肉汤稀释法作为所有NTM的DST方法。尽管会存在一些MAC生长不良，但CLSI目前仍推荐使用经阳离子调节的MH肉汤培养基(含5%OADC，pH 7.2～7.4)。在准备接种物时，尽可能地选择透明菌落。因为相比不透明的菌落，透明的菌落通常毒力更强，对抗菌药物耐药性更强。考虑到与药物存在协同效应的潜能，不能用吐温80等去污剂来分散MAC的菌体团块。

(四)结果报告

除了STR和氯法齐明，其他药物应同时报告

MIC 值并进行结果解释(表 78-5)[11]。对于 STR 和氯法齐明仅报告 MIC 值。由于未经治疗的 MAC 野生株对克拉霉素耐药或处于中间态非常少见，CLSI 委员会建议实验室应重复测试来验证中间态或耐药结果[11]。被证实为中间态的结果可能提示正在出现耐药性；因此，应该认真监测感染此类菌株的患者，对随后分离的 MAC 菌株应进行药敏试验。二线药物(如 MOX 和利奈唑胺)对 MAC 病的人体疗效尚未得到证实，因此，仅当临床医生在治疗 MAC 病方面具备丰富的用药经验或用于研究目的时，才能向他们报告 DST 结果。

表 78-5　推荐用于肉汤微量稀释法检测 MAC 的抗分枝杆菌药物和解释标准

抗分枝杆菌药物	最低抑菌浓度范围(μg/ml)[a]		
	S	I	R
一线			
克拉霉素[b]	≤8	16	≥32
阿米卡星[c]	≤16	32	≥64
二线			
莫西沙星	≤1	2	≥4
利奈唑胺	≤16	32	≥64

注：[a] S. 敏感；I. 中介；R. 耐药；[b] 克拉霉素是大环内酯类唯一需要进行 DST 的经典药物；[c] 阿米卡星的数据来自静脉给药，见参考文献[129]

研究发现在 MAC 菌株中，对 AMK 耐药常常与 *rrs*(16S rRNA 编码基因)的一个或多个突变有关[129]。故此，若计划将 AMK 用于治疗方案中，且肉汤稀释法表明病原菌株似乎对 AMK 耐药时，需要对 *rrs* 进行测序，以确认 1408、1409 和 1411 位碱基有无突变，最终确认表型药敏结果。然而，就算上述突变无一被检测到，也不能推测 MAC 君菌株对 AMK 敏感，因为可能存在其他尚未确认的耐药机制。

五、堪萨斯分枝杆菌

感染堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*，*M. kansasii*)后人体最主要病症就是肺部疾病。美国胸科协会推荐的治疗 *M. kansasii* 肺部疾病的方案由 RIF、INH 和 EMB 组成[9]，其中 RIF 是实现成功治疗的关键组分。另一种有效的替代方案包括 RIF、EMB 和克拉霉素[130]。在接受蛋白酶抑制剂治疗的 HIV 感染患者中用 RFB 取代 RIF[9]。未经治疗患者分离的 *M. kansasii* 对 RIF 敏感。然而，在治疗过程中可能发生 RIF 耐药，临床实验室工作人员通常不知道患者的 RIF 治疗史。因此，所有的 *M. kansasii* 初次分离株应进行 RIF 和克拉霉素的敏感性试验[11]。

如前所述，INH 和 EMB 是用于治疗 *M. kansasii* 感染的一般性方案。但是，这 2 种药物 DST 所得到的 MIC 值与临床响应情况并不完全一致，因而不应报告。另外，EMB 的 MIC 值重现性不好，这也会对医生导致将该药物从治疗方案中移除的误导。

对 RIF 耐药(≥2 μg/ml)的 *M. kansasii* 菌株，应当针对 RFB、AMK、环丙沙星(早期氟喹诺酮类药的代表，其体外活性弱于 MOX)、复方新诺明、利奈唑胺和 MOX 开展 DST。MIC 值和对应的结果解释都应报告给临床。最新版 CLSI 针对分枝杆菌药敏试验给出了推荐性的文件并列出了具体事项。即使 STR 在临床上有疗效，但适用于 NTM 的 MIC 检测折点尚未建立，因此，当测试 NTM 对 STR 是否耐药时，仅报告 MIC 值(不含结果解释)。患者在经过 3～6 个月合适的治疗后，若还能检测到阳性培养物，则需要重做 DST。

六、海分枝杆菌

海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*，*M. marinum*)感染可引起皮肤、软组织和骨骼(偶见)的慢性肉芽肿性损伤(称为“游泳池肉芽肿”或“鱼缸肉芽肿”)。*M. marinum* 分离株对几种临床上使用的抗菌物药物具有典型的敏感性，包括 RIF、EMB、多西环素(或米诺环素)、复方新诺明和克拉霉素[11]。想要实现成功治疗可能需要外科手术切除或清创并同时采用抗菌药物辅助治疗。用于 DST 的药物包括 RIF、环丙沙星、克拉霉素(代表大环内酯类的新药)、AMK、多西环素和(或)米诺环素、利奈唑胺、MOX 和复方新诺明。对于 *M. marinum*，DST 的 MIC 值和结果解释都应报告。最新版 CLSI 针对分枝杆菌药敏试验给出了推荐性的文件并列出了具体事项。如果患者在治疗数月但响应失败，且病原菌培养仍旧阳性时，那么需要对 *M. marinum* 重新进行一次 DST。

七、其他慢生长型 NTM

许多慢速生长型 NTM 的感染可能对人体致病，这些细菌都需要进行 DST。虽然目前这方面的研究数据有限，但是，CLSI 仍建议使用肉汤稀释法[11]。需要检测的一线和二线药物与 *M. kansasii* 所对应药物完全一样，并且它们两者的结果解释标准也相同。总的来说，对戈登分枝杆菌(*Mycobacterium gordonae*，*M. gordonae*)的进行药敏试验是不合适的，因为大部分的分离株其实是污染菌，只有非常少的菌株是真正的病原体。对于如嗜血分枝杆菌(*M. haemophilum*)的苛养菌而言，药敏试验已被进行[131]。然而，没有足够的信息供人们参考以制定标准的测试方法并将之推广。

八、快速生长型分枝杆菌

已经已鉴定出约 90 多种快速生长型分枝杆菌(rapidly growing mycobacteria，RGM)，但是大多数针对人体的疾病都是由脓肿分枝杆菌复合群(*M. abscessus* complex)、龟分枝杆菌(*M. chelonae* complex)和偶发分枝杆菌群(*M. fortuitum* group)所导致的，这些 RGM 是引起皮肤和软组织感染的重要病原菌，特别是容易经由土壤或水污染导致穿透性创伤[132]。*M. abscessus* 复合群是一类能引发肺炎的病原菌，这种肺炎特别容易在囊性纤维化患者中发生。CLSI 推荐的用于 RGM 药敏试验方法主要是基于针对这 3 种/群细菌的研究结果来设计的，但该方法也同样适用于临床上其他重要的 RGM 菌株。对某些药物(例如，克拉霉素、亚胺培南和妥布霉素)而言，DST 结果仅适用于 RGM 中几种特定的菌种/群，因此，强烈推荐优先使用分子生物学方法将分离株鉴定到种的水平。如果在接受合理治疗 6 个月后，在初始感染部位仍旧可培养出与先前一样的 RGM 阳性培养物，那么就需要重新做 DST，并且需要用分子生物学方法确认菌株鉴定的结果是否正确。

(一)试验方法

如前文所述，推荐用微量肉汤稀释法进行 RGM 的 DST。接种物来源于阳离子调节且不含 OADC 的 MH 肉汤培养基[11,133]。需要检测的药物包括 AMK、头孢西丁(最高测试浓度为 256 μg/ml)、环丙沙星、克拉霉素、多西环素(或二甲胺四环素)、亚胺培南、利奈唑胺、莫西沙星、复方新诺明和妥布霉素。由于妥布霉素的 MIC 值常在耐药范围内，因此，其主要用于治疗 *M. chelonae* 感染而不被推荐用于其他 RGM 感染的治疗，除了上述药物以外，对于耐多药的 *M. abscessus* 脓肿亚种，临床实验室可能会被要求进行替加环素和氯法齐明的药敏试验。

孵育时间达到 48～72 h 后就需要对托盘进行第一次检查。这一步很重要，尤其是在检测偶发分枝杆菌、黏液分枝杆菌和耻垢分枝杆菌时。在孵育时间达到 48 h 时这些细菌生长就已十分充分。如果在孵育 48 h 时发现生长对照孔内菌体生长充分(至少 2＋，或者有明确的浊度及成团块状的生长[11])就可记录 MIC 值。若此时生长不充分则需继续孵育至第 3 天时并进行再次观察，如有必要，可在第 4、5 天继续观察。若到了第 5 天对照孔内菌体生长仍旧不充分，那么整个试验就需要重做。如果重做后再次出现生长不充分的情况，则将培养物接种在固体平板上传代，在 35±2℃温度下孵育，之后再去做药敏试验，需要说明的是这个步骤的加入可能有效。此后，如果再次到第 5 天仍未见细菌生长，则报告该细菌在被推荐的检测时间段内不能生长。也可以对 16SrRNA、23SrRNA 的编码基因，以及 *erm* 进行测序，以进一步确定该病原菌对 AMK 和克拉霉素的敏感性到底如何。

第 5 天是除克拉霉素外的所有药物读取药敏结果的最后期限。对于克拉霉素而言，其耐药性可能来源于后期获得、突变或诱导。获得性耐药现象已在 *M. chelonae* 和 *M. abscessus* 复合群的分离株中被发现。这些菌株中所含一个核糖体拷贝在治疗中或治疗后可发生突变，从而导致对大环内酯类药物的耐药。准确来说，就是在 23S rRNA 编码基因的第 2058 或 2059 位(此处借用了 *E. coli* 中相应序列的碱基位置标注)腺嘌呤位点处发生了单碱基对突变。这种耐药类型在初次观察时就能被辨认出并在那时就可发出报告[62,134-135]。

对大环内酯类药物的诱导抗性归因于 *erm* 基因，该基因存在于几种 RGM 基因组。通过表

型药敏试验就可检测出该型耐药。而对一些种/亚种则需要通过分子生物学药敏检测检出。诱导耐药的表型药敏检测需要延长孵育时间。对于克拉霉素来说，最晚读板时间是第 14 天，除非在初次读板时，MIC 就已≥16 μg/ml，那时报告就已被发出。若到了第 14 天，克拉霉素的 MIC 值为 4 或 8 μg/ml 且该药物被考虑用于治疗时，强烈推荐将该 RGM 分离株送到对 NTM 药敏检测具有丰富经验第三方参考实验室进行 DST 结果的确认，如有必要可对 *rpoB* 和 *erm* 基因进行测序。

只有具有 *rpoB* 和 *erm* 基因测序分析经验且已有数据证实测序与进行 14 天孵育克拉霉素 MIC 结果之间具有良好相关性的实验室才可将对大环内酯类药物的诱导耐药基因的检测作为一种选项。当采用这种方法（总结在表 78-6 中）时，需首先对 *rpoB* 测序来鉴定待测菌株。如下这些菌种/亚种含有无功能的 *erm* 或者完全不含有该基因，因此被认为是克拉霉素敏感株[137-138]：龟分枝杆菌（*M. chelonae*）、免疫分枝杆菌（*M. immunogenum*）、黏液分枝杆菌群（*M. mucogenicum* group）、塞内加尔分枝杆菌（*M. senegalense*）、百日草分枝杆菌（*M. peregrinum*）和脓肿分枝杆菌马西里亚亚种（*M. abscessus* subsp. *massiliense*）。在第 3～5 天读取生长结果后，克拉霉素可以和其他药一起被报告为 RGM 的敏感药物（没有 MIC 值）。由于脓肿分枝杆菌 *bolletii* 亚种（*M. abscessus* subsp. *bolletii*）的 *erm* 具有生物功能，因此不管其 MIC 结果如何，该菌在第 3～5 天初次读板时就可报告为克拉霉素耐药（没有 MIC 值）。脓肿分枝杆菌脓肿亚种（*M. abscessus* subsp. *abscessus*）分离株必须进行 *erm* 测序[41]，以准确确定克拉霉素的耐药性[139-140]。表 78-6 展示了基于这些结果的克拉霉素耐药结果的推荐报告方式。除此之外，也必须对表 78-6 中未列举的其他所有 RGM 进行最多 14 天孵育的表型药敏检测。

表 78-6 基于 *rpoB* 序列分析和 *erm* 基因分型对 RGM 克拉霉素耐药性的报告办法

分枝杆菌种/亚种	*erm* 基因型	推荐做法
龟分枝杆菌	无功能或缺失	在第 3～5 天读板后与其他药一起，报克拉霉素敏感（无 MIC 值）
免疫分枝杆菌		
黏液分枝杆菌群[a]		
塞内加尔分枝杆菌		
百日草分枝杆菌		
脓肿分枝杆菌马西里亚亚种[b]		
脓肿分枝杆菌 *bolletii* 亚种	有生物功能	在第 3～5 天读板后与其他药一起，报克拉霉素耐药（无 MIC 值）
脓肿分枝杆菌脓肿亚种	可变	将 *erm*(41)测序，若结果是：
		序列变体Ⅰ，Ⅵ或Ⅶ：在第 3～5 天读板后与其他药一起，报克拉霉素耐药（无 MIC 值）
		序列变体Ⅱ（Mab30，无功能的 *erm*）：在第 3～5 天读板后与其他药一起，报克拉霉素敏感（无 MIC 值）
		截短的 *erm*：进行表型药敏检测直至获得足够的分析数据

注：[a] 包括 *M. Mucogenicum*、*M. phocaicum* 及 *M. aubagnense*；[b] 截短的 *erm*

（二）结果报告

除了用分子生物学方法进行克拉霉素的 DST 外（表 78-6），对每一种药物都需进行 MIC 值的报告并提供一份结果解释（表 78-7）[11]。有少部分的 RGM 菌株几乎总对特定的药物敏感。这对脓肿分枝杆菌复合群和 AMK（之前从未接受过 AMK 治疗的患者）而言是对的。其他组合还包括：偶发分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、黏液分枝杆菌群和亚胺培南；龟分枝杆菌和妥布霉素。因此，如果在上述菌株-药物的组合中有 MIC 值提示耐药，DST 就需要重做且需另外用分子生物学方法（优先 *rpoB* 测序）进行结果解释。若复查后的结果也提示耐药，并且该药物被考虑用于临床，则推荐将相应菌株送往具备资质的参考实验室确认结果。

表 78-7 RGM 微量肉汤稀释法药敏试验结果的解释标准[a]

抗菌药物	不同药物的 MIC 范围(μg/ml)		
	敏感	中介	耐药
阿米卡星[b]	≤16	32	≥64
头孢西丁	≤16	32～64	≥128
环丙沙星[c]	≤1	2	≥4
克拉霉素[d]	≤2	4	≥8
多西环素/米诺环素	≤1	2～4	≥8
亚胺培南[e]	≤4	8～16	≥32
利奈唑胺	≤8	16	≥32
莫西沙星	≤1	2	≥4
复方新诺明	≤2/38		≥4/76
妥布霉素[f]	≤2	4	≥8

注:[a] 表格和脚注摘录自参考文献[11]。[b] 脓肿分枝杆菌分离株的阿米卡星值为≥64 μg/ml 时应该重复检测。如果复查的值仍然为≥64 μg/ml 时,则结果报告时应做如下备注:"该菌株 MIC 值高于预期,该药物若考虑用于临床,需通知本实验室将该分离株送往参考实验室以便验证该耐药性"。[c] 环丙沙星和左氧氟沙星可以互换,两者的体外活性比新药 8-甲氧基氟喹诺酮类药物低。[d] 参考本章内容和 CLSI 的 M24 文件有关 RGM 中克拉霉素药敏试验和结果解读的指南。克拉霉素是大环内酯类(如阿奇霉素和罗红霉素)新药的代表。[e] 如果偶发分枝杆菌、耻垢分枝杆菌群和黏液分枝杆菌 MIC 值>8 μg/ml,则应该重复测试,孵育时间不超过 3 天。如复查的结果值仍为>8 μg/ml,则参考本章内容和 CLSI 的 M24 文件有关 RGM 中亚胺培南药敏试验和结果解读的指南。亚胺培南的结果不能用来预测厄他培南或美罗培南的药敏结果。亚胺培南对快速生长分枝杆菌的活性比美罗培南或厄他培南高。[f] 妥布霉素主要用于对龟分枝杆菌感染的治疗。如该分离株妥布霉素值 MIC 为>4 μg/ml,应重复测试。如复查的结果仍为 MIC>4 μg/ml,则结果报告时应备注:"MIC 值高于预期;如果该药物正被考虑用于临床治疗,应告知实验室以便将该分离菌株送往参考实验室以便验证该耐药性"

九、诺卡菌和其他需氧放线菌

(一)临床意义

诺卡菌属和其他需氧放线菌(马杜拉放线菌、马红球菌、戈登属、冢村氏菌属和罕见的链霉菌属)能在免疫功能低下人群中引起严重疾病,但也偶尔感染健康人群[141-148]。所有具有临床意义的分离株均应进行体外药物敏感性试验,以指导临床治疗和耐药监测。另外,强烈推荐使用分子生物学方法或蛋白质组学方法将临床上几种重要病原菌鉴定到种水平,特别是对诺卡菌,因为针对不同种的诺卡菌的感染用药组合不同。

马杜拉放线菌常引起肉芽肿性皮肤感染(足分枝菌病),该病在美国偶尔检出,但在印度、非洲、南美和中东却要普遍得多。相反,戈登属和冢村氏菌属的感染更为常见且在全球的临床实验室检出的频率越来越高。这些微生物常导致菌血症(特别是导管相关性脓毒血症)、呼吸、皮肤和中枢神经系统相关感染。

(二)检测方法

诺卡菌属和其他需氧放线菌药敏试验的推荐方法是微量肉汤稀释法[11]。此外,根据最近的一项多中心重复性研究结果,当检测诺卡菌属的接种量是否足够和验证磺胺异噁唑时可以考虑使用纸片扩散法检测磺胺异噁唑(250 μg 的纸片)的敏感性[149]。因为马红球菌可以在大多数革兰阳性菌药敏试验中孵育的 24 h 内生长,所以它的 DST 可以依据 CLSI M07 和 M100 文件最新版本所描述的葡萄球菌 DST 指南进行。

与马红球属类似,戈登属和冢村菌属通常比绝大多数其他需氧放线菌生长快些。因此,重要的是在孵育 48 h 后检查生长对照孔,以确定生长是否足以读取 MIC 值。这两属的 MIC 推荐检测方法与诺卡菌是相同的。戈登属的菌株通常对用于诺卡菌的测试药物泛敏感,而冢村菌属的菌株可能对头孢曲松钠的耐药性不定,更多时候是对阿莫西林克拉维酸的耐药。

推荐的用于 DST 的抗菌药是 AMK,阿莫西林克拉维酸、头孢曲松、环丙沙星、克拉霉素、多西

环素和(或)米诺环素、亚胺培南、利奈唑胺、莫西沙星、甲氧苄氨嘧啶和妥布霉素。对红球菌属而言还需补充2种药物：万古霉素和RIF。虽然推荐使用肉汤稀释法，但是对于一些菌株和药物的组合，DST结果准确性可能受到质疑。例如，当进行巴西诺卡菌药物敏感性试验时，头孢曲松可能出现假耐药结果，而当进行皮疽诺卡菌药敏试验时，亚胺培南可能出现假耐药结果。此外，用微量肉汤稀释法进行盖尔森基兴诺卡菌和华莱士诺卡菌对头孢曲松；以及所有菌种，特别是皮疽诺卡菌和华莱士诺卡菌对磺胺类药物的敏感性试验时重复性会存在问题[149]。磺胺类药物DST结果的问题很可能是由于未能正确读取80%的生长的技术问题。头孢曲松的DST结果与可变的β-内酰胺酶表达量有关。然而，需要进一步对这一潜在问题进行彻底研究。

CLSI的M24文件详细描述了接种物的制备。首先，挑取血平板或胰酶大豆琼脂平板上已经在35±2℃空气环境中充分培养(通常为3～7天)的菌落，将其移种至已补充阳离子的肉汤、无菌去离子水或生理盐水中制备浓菌悬液。使用微小碾磨棒或玻璃珠并搭配涡旋振荡器激烈混匀破碎大块的微生物。将菌悬液放置约15 min，使团块沉淀下来。在与实验室比浊仪相匹配的试管中，将几滴上清液添加到2 ml无菌水或生理盐水里，并用比浊仪将悬液浊度调至0.5麦氏单位。

微孔板和MH琼脂平板在正确接种后，就需要孵育。微孔板用黏性的薄膜封口，放在塑料袋内，在35±2℃的空气中孵育。在生长48～72 h后进行菌的生长情况评估。如果生长对照孔中放线菌生长充足，那么就可以记录MIC值；如果生长不佳，那么平板就需重新孵育至最多5天。这期间每天都需要记录结果，直到菌体充分生长。对于马杜拉放线菌属而言情况则不一样，为了保证其充分生长，它需要孵育至最多10天。然而，当孵育时间趋向于超过5天时，β-内酰胺类药物、碳青霉烯和四环素等的MIC值可能会因药物的降解而变得不准确。

为了评估接种物的量是否足够，应评估在35±2℃的空气环境中孵育3～5天后磺胺异噁唑纸片扩散法DST中细菌的生长量。生长应表现为出现明显的条纹痕迹，条纹之间有清晰的区分区域，而不应是融合的区域。

与NTM一样，MIC是抑制所有药物(除甲氧苄氨嘧啶-磺胺甲基异噁唑以外)可见生长的最低浓度，对于该药物，检测端点是达到80%生长抑制的孔(与阳性对照孔相比)。然而，准确定义80%这一比例通常很困难。因此，另一种选择是将MIC解释为与阳性对照孔或含有更高浓度药物的相邻孔相比，MIC值对应的孔内菌的生长明显有差异。

(三)结果报告

根据CLSI的M24文件所描述的，对于微量肉汤稀释法，应该报告诺卡菌属和其他需氧放线菌的MIC值并对结果进行解释。磺胺异噁唑纸片扩散法的解释如下：抑菌圈直径≥35 mm为敏感，抑菌圈直径≤15 mm为耐药[149]。由于目前没有足够的数据来确定中间敏感的折点，所以抑菌圈直径为16～34 mm的结果还无法解释。如果肉汤稀释法和纸片扩散法结果不符，应进行2种方法的重复试验或送到具备相关经验的参考实验室进行检测。因为大多数的诺卡菌对磺胺类药物敏感，所以遇到耐药结果，先不能报告，应直到该结果被具备诺卡菌药敏试验丰富经验的第三方参考实验室验证后才可以报告耐药。

(四)质量控制

当使用新批号或新到货的药敏测试板时，应当进行质控(质量控制)试验。此后，质控试验至少应每周进行1次，或者进行DST的频率小于每周1次时，应当在每次对患者标本进行DST的同时，进行质控试验。然而，当实验室缺乏对这些微生物的药敏检测经验或者仅进行类似检测时，则强烈推荐在每天对患者的临床分离株进行DST的同时，进行质控试验，直到累积的质控数据表明该实验室可将质控试验的频率设置为每周1次。进行药敏试验的实验室应当测试被CLSI推荐的菌种。目前，对于需氧放线菌的DST，缺乏成熟的商品化方法。因此，鼓励临床实验室在进行常规熟练度测试程序以外，将本室结果与经验丰富的参比实验室进行对比，以评估自身的检测性能。这种室间对比，也可直接替代本室内熟练度测试程序。

(五)来自CLSI的DST检测建议更新

2018年，CLSI将更新M24文件关于分枝杆

菌、诺卡菌和其他需氧放线菌 DST 操作和结果解释的内容[150]（译者注：到本书出版时，相关更新已完成）。这些更新的标准用于替代 2011 年出版的旧文件[11]。改变的内容包括更新的折点、质控表和质控开展的推荐频率。另有其他的改变，例如，对分枝杆菌分子药敏测试作了更详细的描述，以及用不同 DST 方法对 RIF 和 EMB 低水平耐药的检测的困难。关于最新的药敏检测的推荐意见，可查询该文件。

参考文献请扫二维码查阅

第79章 抗菌药物耐药性的分子检测

APRIL N. ABBOTT, FERRIC C. FANG

（李荷楠 译；刘文恩、俞云松 审校）

抗菌药物耐药性检测是临床微生物实验室最重要的职责之一，通常是通过表型检测获得（第73～75章）。但是表型检测方法的局限性之一是延迟了恰当的治疗，从而对临床预后带来不利影响[1-4]。由于大部分临床上重要的抗菌药物耐药均有遗传学基础，而且分子生物学方法具有快速、自动化并且不需要增菌等优点，因此，直接检测耐药性的分子方法在理论上很有吸引力。分子检测耐药基因的方法也面临巨大挑战，最重要的原因是抗菌药物耐药的遗传复杂性。细菌可通过获得耐药基因（如β-内酰胺酶基因）产生耐药，也可以通过基因表达水平的改变（如外排泵、膜孔蛋白）或基因突变（如氟喹诺酮类靶基因突变）获得耐药性。假如耐药基因低表达或者未表达，那么该基因的检出也许并不意味着耐药表型的出现。另一方面，在某些情况下，基因型的检测方法会优于表型的检测方法，例如，存在异质性耐药或耐药表型在体外实验条件下表达很弱，如甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*，MRSA）、肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶（*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases，KPCs）或新德里金属-β-内酰胺酶-1（New Delhi metallo-β-lactamase-1，NDM-1）。耐药基因多样性的不断增加很可能会给分子检测方法的敏感性带来源源不断的问题。PCR抑制剂的存在、核酸的提取效率低和其他技术问题均会干扰检测，因此，检测方法必须包括内部质控。对于大多数可能有兴趣应用分子方法检测耐药性的临床实验室来说，高昂的费用是另一限制因素。因此，目前的分子方法仅局限于对少数常见且耐药机制非常明确的抗菌药物耐药性检测。很多正在研究的检测方法显示了很好的前景，将来应用分子诊断工具检测抗菌药物耐药性将会变得更加普遍。本章对当前美国FDA批准的检测抗菌药物耐药性的分子方法做一概述。另外，本章也简单讨论了一些正在发展的商业化检测方法，也涉及了特殊的分析试剂和自主研发的方法，但对常规临床实验室来说并不现实，感兴趣的读者可参考其他资料[5-6]。

一、技术

尽管临床微生物实验室使用分子方法并不是新事物，但近期技术的发展使得实验室在几乎不需要对人员进行先进分子技术培训的情况下，即可使用易于操作的仪器设备进行检测。耐药检测可以直接使用临床样本（主要用于耐药监测），也可以使用培养分离株（如阳性血培养菌株）。用于确证试验的参考菌株可以很便利地从美国典型菌株保藏中心（American Type Culture Collection，ATCC）等机构获得[7]。目前美国FDA批准用于检测耐药性的分子技术基于2种方法：PCR和固相微芯片。要想比较这2种方法用于分子耐药检测的优缺点，首先应该明确两者之间的关键差异。实时定量PCR核酸扩增可以直接用样本进行扩增，但由于受荧光数量的限制，不能同时检测多个靶基因。解决办法之一是进行独立的靶基因扩增和检测。在FilmArray（BioFire公司）系统中，首先进行多重PCR扩增，随后将产物分配到不同的孔中完成第二轮PCR扩增和检测。与基于PCR技术的检测方法相反，固相或液体微芯片能同时检测数百个靶基因，但它们需要高的靶基因拷贝数，这限制了其对于病原体数量较少的临床样本的直接检测。不同于PCR检测技术，目前临床实验室仅在少数情况下采用微芯片技术直接从样本

中检测抗菌药物耐药性[8]。然而，扩增和微芯片技术的联合应用在研究机构中已经是常规技术，且在临床实验室中的应用有可能会越来越多。其中一个例子是 FDA 批准的 Verigene 呼吸道病毒检测技术(Luminex 公司)，即先进行核酸扩增，然后进行微芯片的检测。在美国以外的地区，这种方法也用于检测由 H275Y 突变引起的奥司他韦(oseltamivir)耐药。这种联合检测方法将出现在未来的临床应用中。

众所周知，截至 2017 年 7 月，已有 8 个生产商(部分厂家有多个方法)在分子检测抗菌药物耐药性标志物方面获得 FDA 的批准。BD GeneOhm、bioMérieux NucliSENS EasyQ、ELITech ELITe MGB 和 Roche LightCycler 是基于 PCR 且符合 CLIA(临床实验室改进修订案)高复杂度的检测平台。BioFire FilmArray 和 Cepheid GeneXpert 是独立的中等复杂度的 PCR 检测系统。Luminex Verigene 是一个中等复杂度的固相微芯片检测方法，在同一个封闭系统内进行靶 DNA 的提取、靶 DNA 与纳米金颗粒探针杂交和检测等步骤。

广域 PCR 联合电喷雾电离质谱分析(Broad-range PCR with detection by electrospray ionization mass spectrometry)已经被用于商品化的检测系统，该系统整合了微生物鉴定和耐药基因检测(PLEX-ID 或 IRIDICA，Abbott 公司)[9-10]，但该系统高昂的费用限制了其在大部分临床实验室中的应用，并且制造商最近选择不申请 FDA 批准[11]。基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(matrix-associated laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry，MALDI-TOF MS)在临床实验室中可以快速鉴定微生物菌株，但是检测与耐药性有关的蛋白(如 β-内酰胺酶)的敏感性不足。目前已有间接的方法通过 MALDI-TOF MS 检测碳青霉烯酶水解抗菌药物的产物[12-14]，但这些方法的实际效果仍有待考证。从理论上讲，全基因组测序(whole-genome sequencing，WGS)应该是最全面的检测抗菌药物耐药性的分子方法，因为它可以同时检测多种类型抗菌药物的耐药基因[15]。鉴于靶向 PCR 分析很难检测到新的或变异的耐药基因，WGS 在鉴定新的或变异的耐药基因上特别具有吸引力。但是，WGS 与靶向方法相比价格更昂贵，需要生物信息学专业知识，并且目前尚不完全了解基因型和耐药表型之间的关系。与基因表达改变的耐药机制(如孔蛋白和外排泵)相比，特定基因存在与否(例如 β-内酰胺酶、靶基因修饰酶和青霉素结合蛋白)或特征明确的靶位点突变(如 DNA 回旋酶)相关的耐药机制更容易解释。还须考虑不同测序平台的错误率。目前，WGS 技术用于检测抗菌药物耐药性主要限于科研机构。该技术已应用到美国抗菌药物耐药性监测项目，例如，国家抗菌药物耐药性监测系统，该系统用于监测某些肠道细菌如沙门菌的耐药性。未来可能被应用于抗菌药物耐药性检测的其他技术包括变性高效液相色谱法[16-17]和多种深度测序模式[18-19]。目前，美国以外的地区还有一些其他检测方法已被用于临床或正在研发中，相关内容将下文“耐药基因”相关章节进行介绍。

二、耐药基因

(一)甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌

金黄色葡萄球菌是目前工业化国家细菌感染最常见的病原菌[20]。由于 MRSA 引起的有症状感染持续增多而有效治疗方案极少[21-22]，主要精力集中在研发快速检测 MRSA 的方法。然而，甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(methicillin-susceptible *S. aureus*，MSSA)仍是重要的社区获得感染的病原菌，并且其在医院感染中起着越来越重要的作用[23]。MRSA 的快速检测对指导感染控制和抗菌治疗均非常重要。由于 MSSA 感染治疗方案的优化需要不同种类的抗菌药物[3,24-26]，临床上 MSSA 的检测也十分重要。已经证实血培养 MSSA/MRSA 的快速鉴定可缩短住院时间并减少医疗费用[27]。

目前，大多数商品化的 MRSA 分子测定方法是通过检测 *mecA* 耐药基因实现的。这种方法识别 MRSA 的基础是检测 SCC*mec* 基因盒(携带 *mecA* 及其他耐药基因)和侧翼 *orfX* 基因之间连接片段(图 79-1)。值得注意的是，非 *mecA*-介导的甲氧西林耐药机制在大多数当前可用的商品化分子检测系统中会产生假阴性结果，但极少数例外(如 Cepheid Xpert NxG)。尤其具有挑战性的是带有 SCC*mec* 变异体的 MRSA 菌株，例如，Ⅺ型 SCC*mec*，最近在欧洲的牛和人体携带的 MR-

SA 菌株中被发现[28-31]。这种少见的 SCC*mec* 变异体携带 *mecC* 基因，该基因与 *mecA* 基因仅有 70%同源性，使得 MRSA 的分子诊断面临新的挑战[28]。由于那些不能被分子生物学方法检测出来的变异菌株在某些地区的流行程度可能非常高[32-33]，因此，建议使用本地来源的菌株来验证 MRSA 的分子检测方法。单一靶基因检测 MRSA 方法的另一个潜在的缺陷是有些 MSSA 菌株携带 SCC*mec* 残基，这些 SCC*mec* 残基缺少完整的 *mecA* 基因，也称为"空 SCC*mec* 盒"[34-38]。这些菌种表型是对甲氧西林敏感的，但是若采用单一靶基因检测 MRSA 的方法会得到假阳性结果。分子方法检测 MRSA 时可导致假阳性的另一个少见原因是待测菌株携带了无功能的 *mecA* 等位基因[39]。据报道苯唑西林敏感的 *mecA* 阳性金黄色葡萄球菌可回复为耐药表型[40]，这表明将所有携带 *mecA* 的分离菌株视为 MRSA 是最谨慎的方法，无论其体外敏感性如何。

MRSA 分子检测的另一种可选择的方法是联合检测 *mecA* 和金黄色葡萄球菌的另一个特异性位点，如 *sa*442、*nuc*、*femA*、*femB*、*spa* 或 *ldh1*[41-46]（图 79-1）。这种方法可以用来检测 MSSA 和 MRSA。然而，混合样本可能产生模棱两可的结果，特别是 MSSA 和甲氧西林耐药的凝固酶阴性葡萄球菌（coagulase-negative staphylococci，CoNS）同时存在时可能被错误地判断为 MRSA。已有研究发现，来源于前鼻孔样本中甲氧西林耐药的 CoNS 和 MSSA 的共同定植率是 3.4%[43]。也有研究发现极少数金黄色葡萄球菌缺少 *nuc* 或 *spa* 基因[48-49]。

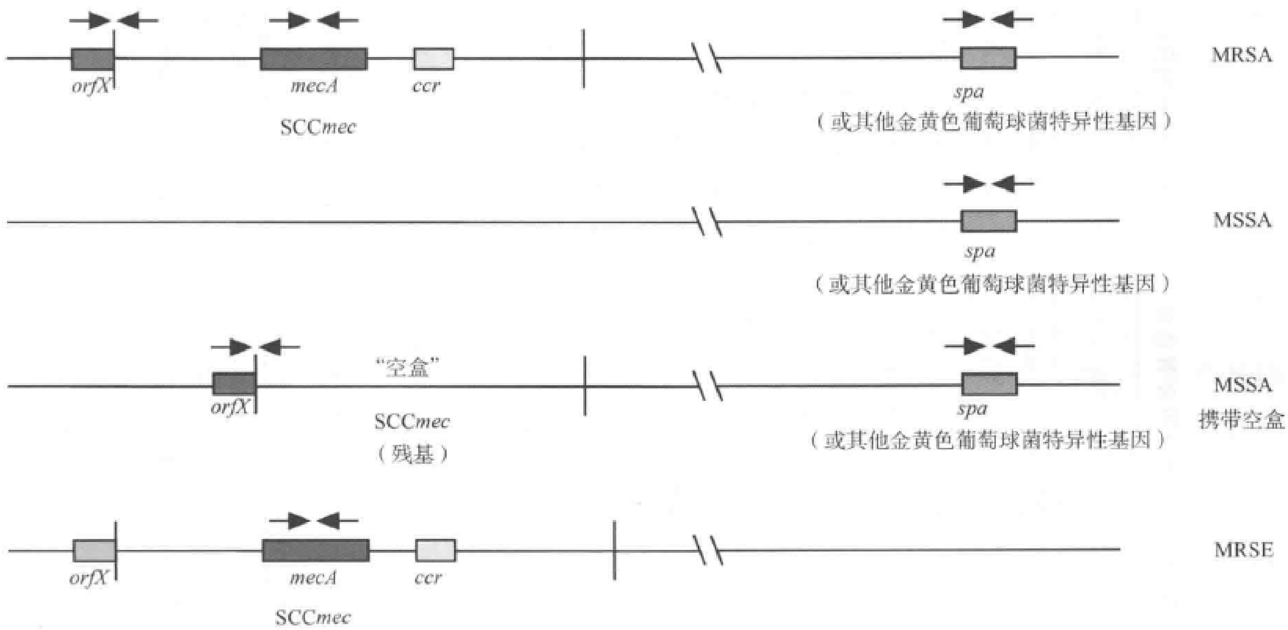


图 79-1　基于 PCR 技术检测 MRSA 的靶基因。*orfX* 是未知功能的可读框，甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌中 SCC*mec* 的插入位点。*mecA* 是青霉素结合蛋白 PBP2′编码基因，与甲氧西林耐药性有关。*ccr* 代表盒式染色体重组酶基因。*spa* 是编码蛋白 A 的基因，金黄色葡萄球菌特异性靶基因的一个例子

在临床实践中，检测金黄色葡萄球菌甲氧西林耐药的分子方法也可用于定植监测和感染的辅助诊断（表 79-1）。美国 FDA 批准的通过鼻拭子监测 MRSA 的方法包括 BD GeneOhm MRSA ACP 和 BD MAX MRSA 试验（Becton Dickinson 公司）、Xpert MRSA NxG 和 SA 检测（Cepheid 公司）、LightCycler MRSA 高级检测（Roche 公司），以及 NucliSENS EasyQ MRSA 检测（bioMérieux 公司）[35-36,50-51]。这些方法均是基于 PCR 检测 SCC*mec* 与 *orfX* 的连接部分。MRSA/SA ELITe MGB 试验（Elitech 公司）用于检测鼻拭子样本，可通过定量比较 *mecA* 和金黄色葡萄球菌靶基因含量来鉴别 MRSA、MSSA 和甲氧西林耐药 CoNS 的混合物。

表 79-1 FDA 批准的甲氧西林耐药金黄色葡萄球菌和万古霉素耐药肠球菌的分子检测方法[a]

检测方法	检测的微生物	试验名称	靶标	目的	标本类型	检测时长(min)	操作时长(min)[b]	程序[c]	LOD[d]
BD GeneOhm	MSSA、MRSA	MRSA ACP	SCC*mec*-*orfX* junction	监测	鼻拭子	60	15[e]	分批处理	130~576 CFU/ 拭子
		StaphSR	SCC*mec*-*orfX* junction	感染	阳性血培养物	60	15[e]	分批处理	10 CFU/rxn
	VRE[f]	VanR	*vanA* 和 *vanB*	监测	肛周、直肠拭子	60	15[e]	分批处理	1~14 CFU/rxn
Cepheid Xpert	MSSA、MRSA	SA Nasal Complete	*spa*、SCC*mec*-*orfX* junction	监测	鼻拭子	50	5	随机进样	300 CFU/ 拭子
		MRSA/SA BC	*spa*、*mecA*、SCC*mec*	感染	阳性血培养物	60	5	随机进样	100~400 CFU/rxn
		MRSA/SA SSTI	*spa*、*mecA*、SCC*mec*	感染	皮肤和软组织拭子	60	5	随机进样	51~242 CFU/ 拭子
	VRE[f]	vanA	*vanA*	监测	直肠拭子	45	5	随机进样	37 CFU/ 拭子
ELITech ELITe MGB	MRSA、MSSA	MRSA/SA ELITe MGB	*mecA* 或金黄色葡萄球菌靶标	监测	鼻拭子	120	15	分批处理	165 CFU/拭子
Roche LightCycler	MRSA	MRSA advanced test	SCC*mec*	监测	鼻拭子	75	15	分批处理	240 CFU/ 拭子
NucliSENS EasyQ	MRSA	MRSA	*mecA*、SCC*mec*	监测	鼻拭子	90	15	分批处理	182~493 CFU/ 拭子
OpGen PNA FISH	MRSA、MSSA	*mecA* XpressFISH	*mecA*	感染	阳性血培养物	120[g]	15	随机进样，手动	$8.1\times10^{4}\sim2.8\times10^{5}$ CFU/ml
BioFire FilmArray	MRSA、MSSA、MSSE、MRSE、VRE	BCID	葡萄球菌和肠球菌靶标、*mecA*、*vanA*、*vanB*	感染	阳性血培养物	60	5	随机进样	$6.12\times10^{7}\sim9.50\times10^{8}$ CFU/ml
Nanosphere Verigene	MRSA、MSSA、MSSE、MRSE、VRE	BC-GP	葡萄球菌和肠球菌靶标、*mecA*、*vanA*、*vanB*	感染	阳性血培养物	150	5	随机进样	$1.9\times10^{5}\sim1.2\times10^{8}$ CFU/rxn

注：[a] LOD. 检测限；rxn. 反应；BCID. 血培养鉴定；BC-GP. 革兰阳性血培养物；MSSE. 甲氧西林敏感的表皮葡萄球菌；MRSE. 甲氧西林耐药的表皮葡萄球菌；[b] 操作时间可随检测标本量而变化；[c] 为确保批量处理结果的可靠性，检测需要较长的操作时间和(或)每次运行需包含外部质控；[d] 对于多靶标检测，检测限随靶标各异，范围见上表；[e] 使用 Cepheid Lightcycler 进行检测，而不是 BD MAX automation；[f] 实验并非检测肠球菌，仅检测相关耐药基因；[g] 在使用本测定之前，需要通过其他方法测定金黄色葡萄球菌

联合检测MRSA和MSSA以辅助感染诊断的方法包括BD GeneOhm StaphSR试验(Becton Dickinson公司)、Xpert MRSA/SA BC检测和Xpert MRSA/SA SSTI检测(Cepheid公司)、Verigene革兰阳性菌血培养检测(Luminex公司)和*mecA* XpressFISH检测(OpGen公司)。当血培养出现革兰阳性球菌生长时,即可采用BD GeneOhm Staph SR、Xpert MRSA/SA BC检测和Verigene革兰阳性菌血培养检测快速鉴定MRSA和MSSA[52-53]。另外,Verigene方法也能检测其他革兰阳性病原菌[54],并可依靠特异的靶基因将金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、路邓葡萄球菌与葡萄球菌其他种进行区分。这种方法只有在检测到特定葡萄球菌种存在时才会报告甲氧西林耐药。在多种微生物混合培养中,由于*mecA*阳性可能难以解释,因此,不能根据*mecA*检测结果推断病原菌对甲氧西林的敏感性[55]。Xpert MRSA/SA SSTI检测可用于皮肤或软组织感染拭子的MRSA和MSSA检测[53]。尽管任何分子方法都可能从非活性生物体中检测到DNA的存在,这个特点在皮肤软组织MRSA/SA感染检测的方法中问题尤其突出,这是因为严重软组织感染的患者在采集用于病原菌诊断的标本之前,常常已经使用抗药物进行经验性治疗。与培养方法相比,标本采集前3周内接受过抗药物治疗的患者采用MRSA/SA SSTI法检测MSSA和MRSA的假阳性率分别是13.8%和9.5%(包装说明书)。另外,多种不同葡萄球菌混合感染时,MRSA/SA SSTI检测可能产生错误的结果。

目前,正在研发的商品化的多种病原菌检测方法中能区分MRSA和MSSA的方法包括FilmArray BCID Panel(BioFire公司)、VYOO病原体检测试验(Analytik Jena公司)、革兰阳性菌12 Easy-Plex panel(AusDiagnostics公司)[56]、SepsiTest检测(Molzym公司)。尤其是VYOO和SepsiTest试验方法,由于不需要培养,直接检测全血中的病原菌,因而得到广泛关注,但初步研究结果显示其与传统培养结果一致性较差[57-58]。*mecA* XpressFISH方法是在血培养金黄色葡萄球菌阳性、头孢西丁诱导*mecA*表达后进行检测。与其他检测方法一样,在与其他葡萄球菌菌种混合的培养物中,区分MSSA和MRSA的准确性不是最好的[59]。

(二)万古霉素耐药肠球菌

肠球菌是胃肠道、女性生殖道的共生菌,引起约10%的医院内感染[60-61]。绝大多数肠球菌感染由粪肠球菌、屎肠球菌引起,且主要发生在长期监护的患者中(如重症监护病房患者、移植患者、肿瘤患者和血液透析患者)。由于万古霉素常用于疑似肠球菌血流感染的经验用药,因此在住院患者中出现万古霉素耐药肠球菌(vancomycin-resistant enterococci, VRE)引起了特别关注[62]。VRE感染会增加发病率和病死率,主要是由于VRE易感染存在高风险并发症的患者[63]。

在美国,约30%的肠球菌分离株对万古霉素耐药[61]。肠球菌通过获得携带*vanA*或*vanB*耐药基因的可移动遗传元件,从而对万古霉素产生高水平耐药。然而,最近新变异体的出现和播散,如*vanM*,引起了人们的关注[64]。用于*vanA*和*vanB*的分子检测方法无法检测由*vanC*决定子引起的低水平内源性万古霉素耐药肠球菌,如鹑鸡肠球菌(*E. gallinarum*)和铅黄肠球菌(*E. casseliflavus*)[65]。在美国,与粪肠球菌相比,屎肠球菌更易对万古霉素耐药,且与*vanB*相比,*vanA*耐药基因更常见。因此,目前市场上鉴定VRE的分子检测方法主要是通过检测*vanA*耐药基因的存在。虽然*vanA*耐药基因的检测已被证明具有较高的特异性(除罕见报道存在携带*vanA*耐药基因的金黄色葡萄球菌、链球菌)[66-67],但传统培养方法仍是必需的,其有利于明确*vanA*基因检测与VRE的关联、药敏试验及暴发流行时菌株的分型。此外,当出现携带*vanB*基因的VRE局部流行时,需考虑选择适当的分子检测方法,因为并非所有商品化试剂盒均可检测此类菌株。最近加拿大和挪威报道了万古霉素耐药性可变的屎肠球菌(vancomycin-variable *E. faecium*, VVE)。VVE菌株携带一个沉默的*vanA*基因拷贝,在表型上对万古霉素敏感,但在万古霉素治疗期间有可能恢复为耐药表型[68-71]。

快速检测VRE定植有助于预防医院内感染,特别是在有很高的VRE定植和感染风险的危重患者中(如ICU、肿瘤科和移植的患者)。目前在美国,已有2种采用肛周和直肠拭子标本进行VRE检测的方法(表79-1)被FDA批准上市。GeneOhm VanR(BD公司)和Xpert VanA(Ceph-

eid公司)2种方法均针对 *vanA* 基因进行检测，该基因为北美肠球菌中最常见的万古霉素耐药基因[72]。此外，VanR方法亦可检测 *vanB* 基因。然而，许多研究显示，粪便或直肠标本中检出 *vanA* 基因，但肠球菌培养阴性，这些研究降低了该检测靶标的阳性预测值。*vanB* 基因也被证明存在于多种共生的非肠球菌菌株，如缓症链球菌(*Streptococcus mitis*)、解没食子酸链球菌(*Streptococcus gallolyticus*)、迟缓埃格特菌(*Eggerthella lenta*)、梭菌属某些种(*Clostridium* spp.)和酸奶瘤胃球菌(*Ruminococcus lactaris*)[8,73]，因此，分子检测 *vanB* 基因阳性时必须进行培养验证。

FilmArray(BioFire公司)和Verigene革兰阳性菌血培养检测(Luminex公司)已被美国FDA批准用于鉴定血培养阳性培养物中是否存在肠球菌，且同时检测 *vanA* 及 *vanB* 耐药基因是否存在(表79-1)。由于Verigene试验的革兰阳性菌和革兰阴性菌的靶标位于不同的面板上，因此，该方法首先需要进行革兰染色以确认是否存在革兰阳性菌。该方法以 *hsp60* 为靶标检测粪肠球菌和屎肠球菌，但不能检测其他肠球菌菌种。在VRE相关血流感染中，该法可准确识别绝大多数VRE(携带 *vanA* 或 *vanB* 基因)[74]。另外，FilmArray可通过靶向 *rpoB*，以及检测 *vanA* 或 *vanB* 来报告VRE，从而对肠球菌进行属水平的鉴定。

(三)革兰阴性菌的β-内酰胺酶

抗菌药物使用的最大威胁之一是革兰阴性菌可产生水解广谱青霉素类、头孢菌素类及碳青霉烯类抗生素的β-内酰胺酶。这些酶包括超广谱β-内酰胺酶(extended-spectrum β-lactamases，ESBLs)、头孢菌素酶(AmpCs)及碳青霉烯酶(carbapenemases)[75-79]。准确检测广谱β-内酰胺酶对于感染控制、治疗均是十分重要的，但基于MIC及其他表型检测广谱β-内酰胺酶的方法多是不完善的[78,80]。针对广谱β-内酰胺酶快速而廉价的分子检测方法具有较大的临床价值，然而目前尚无这样一种检测方法。对分子检测最大的挑战在于β-内酰胺酶的多样性，现已发现200余种ESBLs和多种类型的碳青霉烯酶，后者包括KPC、NDM-1、VIM(Verona整合子编码的金属-β-内酰胺酶)、IMP(亚胺培南金属-β-内酰胺酶)及OXA(苯唑西林酶)。此外，还需考虑到β-内酰胺酶基因的检测不能反映基因的拷贝数和表达情况，而这两者是β-内酰胺抗生素耐药表型的决定因素。

许多商品化的广谱β-内酰胺酶分子检测方法正处于评估阶段(表79-2)。Check-Points公司(Wageningen，荷兰)提供一种名为Check-MDR检测方法，其联合实时PCR和微芯片技术，可检测多种ESBLs(TEM、SHV和CTX-M)、AmpCs(CMY、ACC、DHA和ACT/MIR)及碳青霉烯酶(KPC、NDM、VIM、IMP和OXA-48)[81-83]。BD MAX检测平台(Becton-Dickinson公司)提供一种仅限科研用的CRE检测方法，该法可检测KPC、NDM、OXA-48基因。Hyplex系统(Amplex Diagnostics GmbH公司)可检测ESBLs(TEM、SHV和CTX-M)或碳青霉烯酶(VIM、IMP、KPC、OXA-48和NDM)，它是以酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immuno bent assay，ELISA)的原理检测多重PCR产物[84]。NucliSENS EasyQ platform(bioMérieux公司)提供一种KPC检测方法[85]，VYOO panels(Analytik Jena公司)中包含少量β-内酰胺酶靶标。目前，美国FDA批准的试验主要集中在检测流行病学关注的特定碳青霉烯酶基因。Cepheid XpertCarba-R试验可检测KPC、NDM、VIM、IMP和OXA-48。FilmArray(Biofire公司)和Verigene血培养检测(Luminex公司)可直接从阳性血培养物中检测革兰阴性病原菌，同时可检测耐药靶标。FilmArray仅检测1个碳青霉烯酶耐药靶标(KPC)，而Verigene可检测多个β-内酰胺酶靶标(包括CTX-M、KPC、NDM、VIM、IMP和OXA)。

革兰阴性菌β-内酰胺类抗菌药物耐药的分子检测报告和临床解读很有挑战性，尤其是不能仅依据耐药基因是否检出判断细菌对抗菌药物的敏感性。任何分子检测均不可能是全面的，并且单一细菌可能产生多种β-内酰胺酶，或存在非β-内酰胺酶介导的耐药机制，如外排泵或外膜通透性的降低。因此，当检测到耐药基因时应当报告耐药表型。相反，即使细菌对某种抗菌药物具有表型上的敏感，也可能检测到耐药基因。例如，肠杆菌对某些特定的碳青霉烯类抗菌药物表型敏感，但可检测到碳青霉烯酶基因(如OXA-48或KPC)[86]。美国临床和实验室标准化协会(CLSI)和欧洲抗菌药物敏感试验委员会(EUCAST)推荐只要根据目前的折点，即使检测到碳青霉烯酶基

表 79-2 美国 FDA 已批准的和仅用于科研的革兰阴性菌 β-内酰胺酶分子检测方法[a]

检测方法	靶标	试验名称	认证	目的	标本类型	检测时长	操作时长[b]	程序	LOD[c]
BioFire FilmArray	KPC	BCID	FDA	感染	阳性血培养物	60 min	5 min	随机进样	$0.5\times10^8\sim1.0\times10^8$ CFU/ml
Luminex Verigene	KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48, CTX-M	BC-GN	FDA	感染	阳性血培养物	2 h	5 min	随机进样	$4\times10^5\sim2\times10^7$ CFU/ml
Cepheid Xpert	KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48	Carba-R	FDA	感染或监测	菌落	48 min	5 min	随机进样	1×10^3 CFU/拭子
BD MAX	KPC, OXA-48, NDM	CRE	RUO	感染或监测	菌落	2 h	10 min	随机进样	NA
NucliSENS EasyQ	KPC	KPC	RUO	感染或监测	菌落，直肠拭子，粪便	1 h 40min	15 min	批次进样	1～4 CFU/rxn
Abbott Plex ID	KPC	Broad Bacterial Assay	RUO	感染	阳性血培养物	6 h	>1 h	批次进样	NA
Analytik Jena VYOO	SHV, CTX-M	VYOO 5	RUO	感染	血液	6 h	>1 h	批次进样	3～10 CFU/ml
amplex Hyplex	VIM, IMP, KPC, OXA-48, NDM	Superbug ID	RUO	感染或监测	菌落或直接采样	5 h	30～60 min	批次进样	NA
	TEM, SHV, CTX-M, OXA	ESBL ID	RUO	感染或监测	菌落或直接采样	5 h	30～60 min	批次进样	NA
Check-Points	KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48, ESBL[e], AmpC[f]	Check-MDR CT103[d]	RUO	感染或监测	菌落，直肠或肛周拭子，粪便	6 h	>1 h	批次进样	2～100 CFU/rxn
Check-Points	KPC, OXA-48, VIM, NDM	Check-Direct CPE	RUO	监测	直肠或肛周拭子	1 h 40 min	40～60 min	批次进样	<5 CFU/rxn

注：[a] RUO. 仅用于科研；CTX-M. 头孢噻肟酶；SHV. 巯基多样化 β-内酰胺酶；BCID. 血培养鉴定；BC-GN. 革兰阴性菌血培养；LOD. 检测限；NA. 未知；[b] 粗略估计的操作时间可有不同，与抽提和扩增所采用的方法及样本量有很大联系；[c] 对于含有多个检测目标的实验，检测限依据检测目标的数量而波动，波动范围见上表；[d] 其他 Check-MDR 检测(CT101 和 CT102)配置的靶标更少；还可以使用实时 PCR 仪器将 MDR Carba 和 MDR ESBL 试验用于 β-内酰胺酶检测；[e] ESBL 检测靶标：CTX-M(CTX-M-1 group、CTX-M-1 like、CTX-M-15 like、CTX-M-3 like、CTX-M-32 like、CTX-M-2 group、CTX-M-8 与 CTX-M-25 group、CTX-M-9 group)，TEM(TEM wt、TEM E104K、TEM R164S、TEMR164C、TEM R164H、TEM G238S)，SHV(SHV wt、SHV G238S、SHV G238A、SHV E240K)；[f] AmpC 检测靶标：CMY Ⅰ/MOX, CMY Ⅱ/FOX, ACC, DHA 和 ACT/MIR

因，仍可报告表型敏感[87]。但是，这个推荐是有争议的[80]。动物模型提示，当细菌携带碳青霉烯酶基因时，即使碳青霉烯类抗菌药物的 MIC 在敏感范围内，碳青霉烯类抗菌药物治疗也可能是无效的[88]。一个 CLSI 工作组最近发表了实验室对药敏表型和基因型不一致时的解读办法的指导表格[89]。

三、其他耐药基因

目前，对于其他耐药基因的分子检测方法的商业开发似乎没有引起人们太大的兴趣，下面讨论了一些候选方法。

(一)氨基糖苷类(aminoglycosides)

氨基糖苷类抗菌药物的耐药性最主要是由于修饰酶的作用，如乙酰转移酶(acetyltransferases)、核苷酸转移酶(nucleoditylransferases)、磷酸转移酶(phosphotransferases)和 16S rRNA 甲基化酶等。这些基因可采用 PCR 进行检测，但耐药基因的序列多样性不容忽视。用于检测氨基糖苷类高水平耐药肠球菌的多重 PCR 法已经建立[90]。由于氨基糖苷类抗菌药物主要用于与其他抗菌药物的联合应用，因此对氨基糖苷类耐药基因进行快速检测的需求并不如其他抗菌药物。

(二)厌氧菌(anaerobic bacteria)

厌氧菌对抗菌药物的耐药率有所增长，包括克林霉素(*erm*)、甲硝唑(*nimA*)及碳青霉烯类抗菌药物(*cfiA*)[91]。已建立了可检测这些耐药基因的 PCR 法[92-96]。然而，对厌氧菌进行常规药物敏感性试验的价值仍值得商榷，通常仅在严重感染或患者复发或对经验治疗无效时才推荐检测[97]。

(三)β-内酰胺类抗菌药物耐药肺炎链球菌(β-lactam-resistant pneumococci)

自 1967 年首次报道以来，肺炎链球菌的 β-内酰胺类抗菌药物耐药引起了越来越多的关注[98]。然而，这一耐药问题的出现对分子诊断提出了严峻挑战。β-内酰胺类抗菌药物耐药来源于低亲和力青霉素结合蛋白(PBP1a、PBP2b 和 PBP2x)的嵌合体变异，这些蛋白对青霉素和头孢菌素耐药的影响均存在差异。可采用 PCR 法检测某些最为普遍的耐药性相关变异[99-101]。对肺炎链球菌青霉素耐药性的快速检测的混淆因素之一是依据不同给药方式和感染部位(脑膜炎和非脑膜炎)，肺炎链球菌存在不同的折点。这种检测在呼吸道感染病房的应用是有限的，因为 β-内酰胺类抗菌药物仍可用于由中等水平耐药肺炎链球菌所引起的非脑膜感染的治疗[102]。

(四)头孢曲松耐药淋病奈瑟菌(ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*)

由于临床上检测淋病奈瑟菌大多依赖非培养的方法，因而头孢曲松耐药淋病奈瑟菌的出现尤其受关注。有一种主要在研究机构中使用的方法是利用分子方法检测 *penA* 基因的嵌合变异体，该基因编码青霉素结合蛋白-2(PBP2)，从而导致细菌对 β-内酰胺类抗菌药物的敏感性降低[103]。在将来发展分子技术检测 *penA* 时应考虑共生的奈瑟菌中 PBP2 嵌合体的存在，尤其对于咽部标本可能价值更大[104]。联合检测头孢菌素耐药和喹诺酮耐药突变(见"氟喹诺酮类")，对检测结果为敏感的菌株可使用喹诺酮类。但就目前而言，市场上并无可用于检测耐药淋球菌的分子生物学方法。

(五)达托霉素(daptomycin)

脂肽类抗菌药物达托霉素越来越多地应用于多重耐药革兰阳性菌感染的治疗，包括 VRE 和 MRSA。在耐药可能出现时，达托霉素治疗的有效性开始受到关注。包括治疗 MIC 在目前折点(4 μg/ml)附近的肠球菌血流感染，万古霉素中介的葡萄球菌，或长期治疗[105]。利用分子方法检测达托霉素的耐药性是有吸引力的，但由于多种可能的耐药途径和通过改变基因表达而不是获得新的耐药基因来产生耐药性，因此，仍存在挑战。研究显示达托霉素不敏感主要与细胞膜调控基因(*liaFSR*)或膜成分相关基因(*mprF* 和 *dltABCD*)有关，提示这些位点可以作为未来分子检测的潜在靶标[106-108]。

(六)氟喹诺酮类(fluoroquinolones)

氟喹诺酮类抗菌药物在临床应用广泛，理论上快速检测氟喹诺酮类耐药性很有吸引力。然

而，此类耐药主要是由 *gyrA* 和 *parC* 基因突变所引起的，这些基因编码氟喹诺酮类抗菌药物作用的靶标DNA促旋酶和拓扑异构酶Ⅳ的亚单位。检测这些点突变需要采用测序、微芯片、错配扩增突变分析（mismatch amplification mutation assay）或等位基因特异性PCR（allele-specific PCR）等技术[109-111]。检测淋病奈瑟菌对环丙沙星耐药性的关键分子靶标已被发现，并已经应用于公共卫生机构监测其耐药率[112]。一种以ST131型大肠埃希菌作为检测对象的方法可供选择，这种大肠埃希菌涵盖了美国各地超过1/2的氟喹诺酮耐药大肠埃希菌感染的菌株[113]。尽管靶位点的改变是高水平耐药的主要原因，但低水平的耐药与其他机制有关，因此，采用分子方法检测低水平耐药仍然困难。

(七)利奈唑胺(linezolid)

唑烷酮类药物利奈唑胺是一种用于治疗耐药革兰阳性球菌感染的最后一道抗菌药物。尽管其耐药率不高，但影响到该药物结合位点的突变已有报道。在葡萄球菌和肠球菌中，已报道最常见的利奈唑胺耐药机制是位于23S rRNA Ⅴ区的G2576T突变，可利用该区的突变对耐药性进行分子检测[114]。在建立检测G2576T突变的方法的过程中存在一个混淆因素是耐药水平的表型与rRNA上携带该突变的操纵子的数量有关，因此即使菌株携带有G2576T突变，亦有可能在表型上表现为利奈唑胺敏感。在利奈唑胺耐药菌株中还有一些其他位点突变，如23S rRNA或核糖体L3和L4蛋白的突变，这些突变与耐药之间的具体关联目前仍在研究中。还有报道指出，菌株在获得 *cfr* 基因后可产生利奈唑胺耐药，该基因编码一种23SrRNA甲基转移酶。这一以质粒为载体的耐药机制与利奈唑胺耐药的葡萄球菌所引起的感染暴发有关，且最近在临床分离的粪肠球菌中亦可检测到[115-117]。如果利奈唑胺耐药出现流行，那么针对23S G2576T突变和 *cfr* 基因的分子检测法可能有用处。

(八)大环内酯类(macrolides)

在许多机构内，大环内酯类抗菌药物的耐药成为新兴问题，包括性传播感染性疾病（淋病奈瑟球菌和生殖支原体）和志贺菌引起的胃肠道感染的治疗[118-120]。高水平大环内酯类药物耐药可能与多种机制有关，包括23S核糖体亚基和外排相关基因的突变、靶位点修饰或药物失活。鉴于分子检测在性传播感染性疾病病原检测的重要性，可以同时检测病原体和耐药机制的多重检测是有价值的。

(九)莫匹罗星(mupirocin)

莫匹罗星是一种用于MRSA去定植的异亮氨酰基t-RNA合成酶抑制剂。莫匹罗星耐药由 *mupA* 基因介导，该基因编码莫匹罗星耐药的异亮氨酰基tRNA合成酶。已建立了检测 *mupA* 的分子检测方法[121]，随着莫匹罗星预防性应用的增多，该方法也会逐渐普及[122]。

(十)分枝杆菌属(mycobacteria)

针对异烟肼、利福平、乙胺丁醇、吡嗪酰胺和链霉素等药物耐药性相关突变的快速分子检测方法已经建立，其中有一些已商品化，供科研使用。详情请参照第78章。

(十一)多黏菌素类(polymyxins)

多黏菌素的耐药机制尚未完全阐明。但是，许多基因位点可以通过改变革兰阴性菌的外膜影响多黏菌素的敏感性[123]，现在已经明确的有 *lpx*，*phoPQ* 和 *mgrB*。可移动的多黏菌素耐药基因 *mcr*-1 近来引起了全球关注，在多个地区启动监测，包括美国疾病预防控制中心和预防性抗生素耐药性实验室网络（Prevention Antibiotic Resistance Lab Network）。值得注意的是，*mcr*-1 特异性PCR方法无法检测到近期报道的变异体 *mcr*-2 和 *mcr*-3 或其他耐药机制。

(十二)甲氧苄啶(trimethoprim)

甲氧苄啶的靶标是 *dfr* 基因所编码的二氢叶酸还原酶，*dfr* 基因突变体的相关报道逐渐增加，多见于导致尿路感染的大肠埃希菌中，有时插入至整合子内[124]。快速检测常见的 *dfr* 突变有助于鉴别出经验性使用甲氧苄啶-磺胺甲唑治疗可能无效的患者。

四、结论

目前，美国FDA已经批准的采用分子方法检

测抗菌药物耐药性的方法仅限于 MRSA、VRE 和革兰阴性菌的某些 β-内酰胺酶，并且主要采用 PCR 和固相微芯片技术。在使用这些检测方法时必须认真关注用于检测的特定靶标，因为可能出现潜在的假阳性和假阴性结果。需对标本类型、标本量、操作及周转时间、所需要的条件及成本进行综合考虑后，再选择特定的分子检测方法。尽管基因多样性和成本问题是重要障碍，但用于检测革兰阴性菌广谱 β-内酰胺酶的新方法仍前景可观。随着对于细菌耐药快速检测愈发迫切的临床需求和多种新技术的日渐成熟，细菌耐药性的分子诊断在未来可见的若干年内将得到广泛应用。

参考文献请扫二维码查阅

索　引

B

C

D

H

J

K

L

M

N

O

P

Q

R

T

X

Y

Z

彩　　插

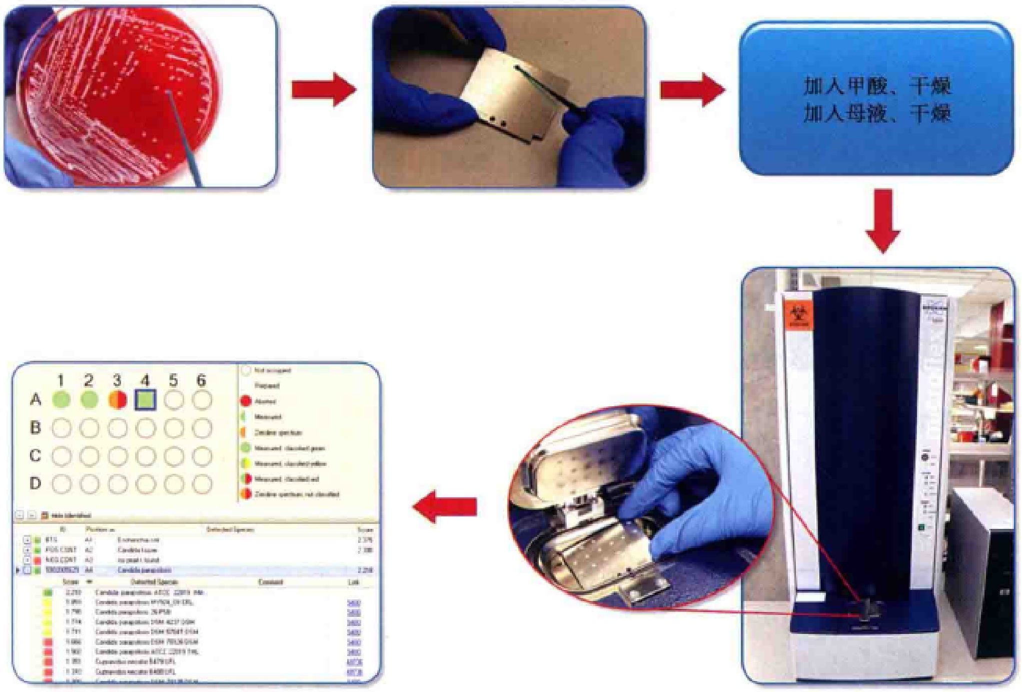


图 5-1

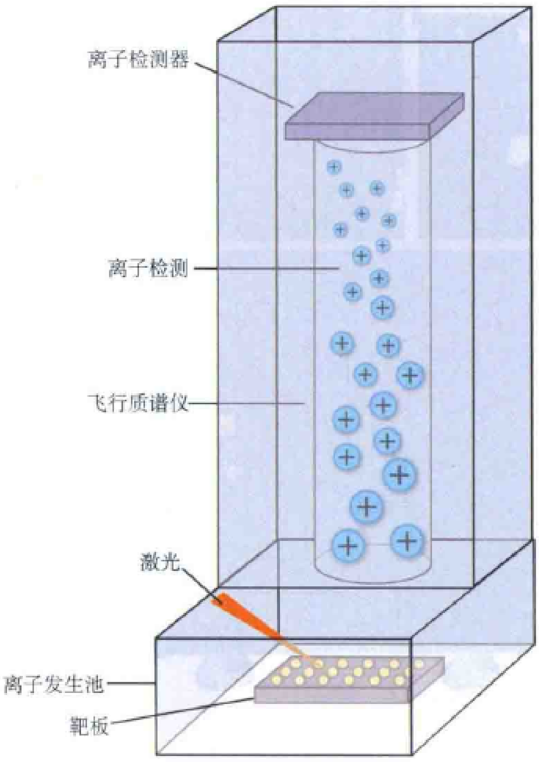


图 5-2



图 6-1



图 6-2

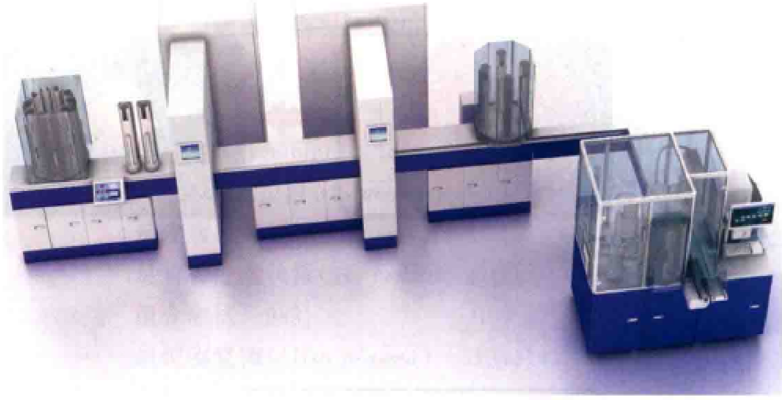


图 6-6



图 6-7



图 7-1

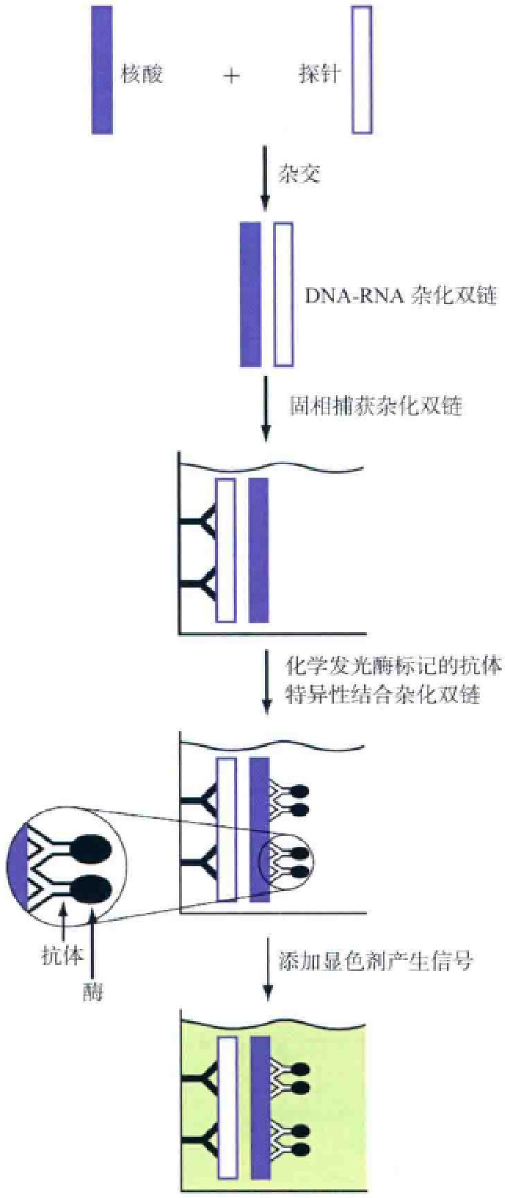

核酸
+
探针
杂交
DNA-RNA 杂化双链
固相捕获杂化双链
化学发光酶标记的抗体
特异性结合杂化双链
抗体
酶
添加显色剂产生信号

图 7-3

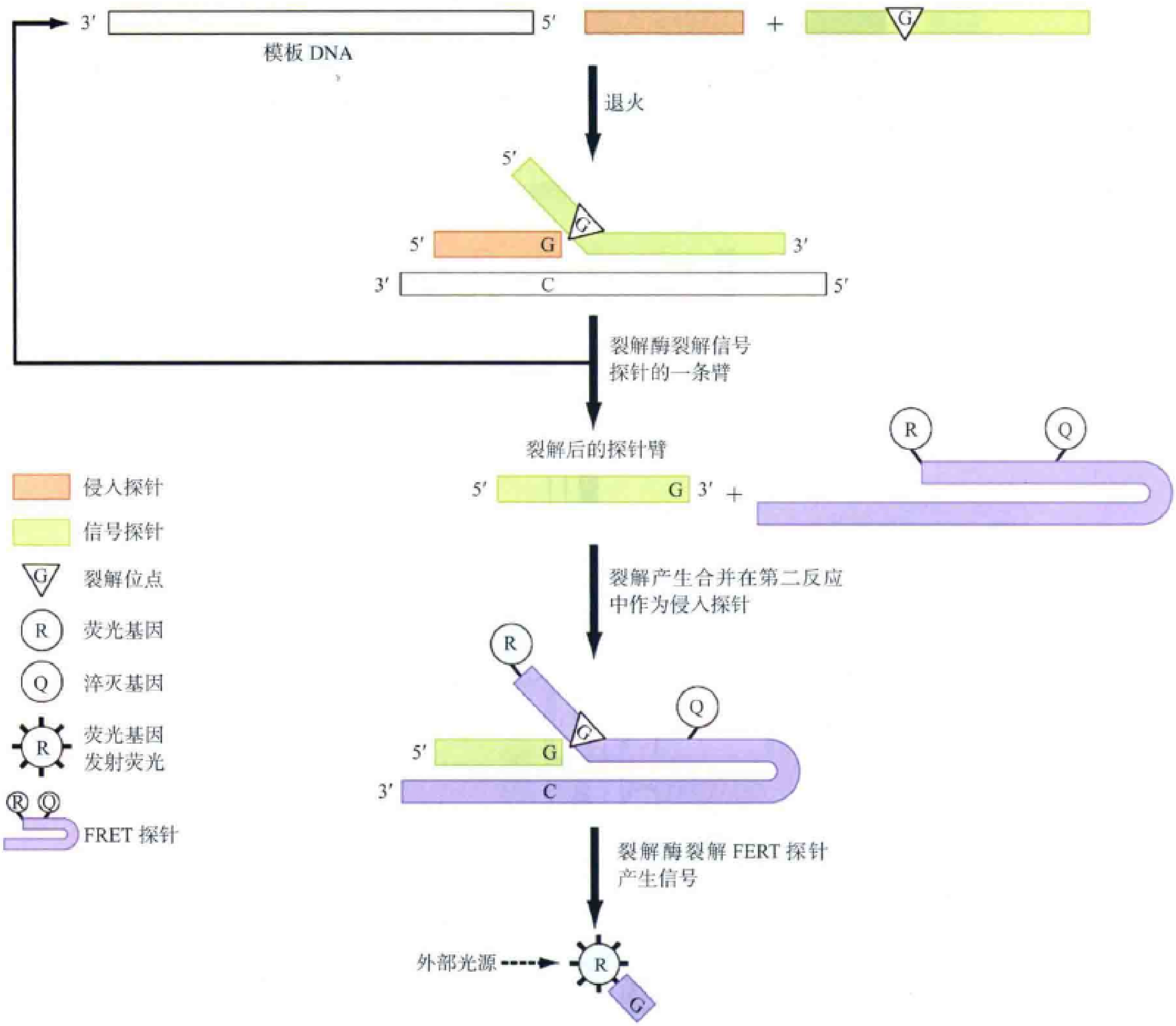

3′
5′
模板DNA
退火
5′
G
5′
G
3′
3′
C
5′
裂解酶裂解信号
探针的一条臂
裂解后的探针臂
5′
G
3′
R
Q
侵入探针
信号探针
裂解位点
荧光基因
淬灭基因
荧光基因
发射荧光
FRET探针
裂解产生合并在第二反应
中作为侵入探针
5′
G
3′
C
裂解酶裂解FERT探针
产生信号
外部光源

图7-4

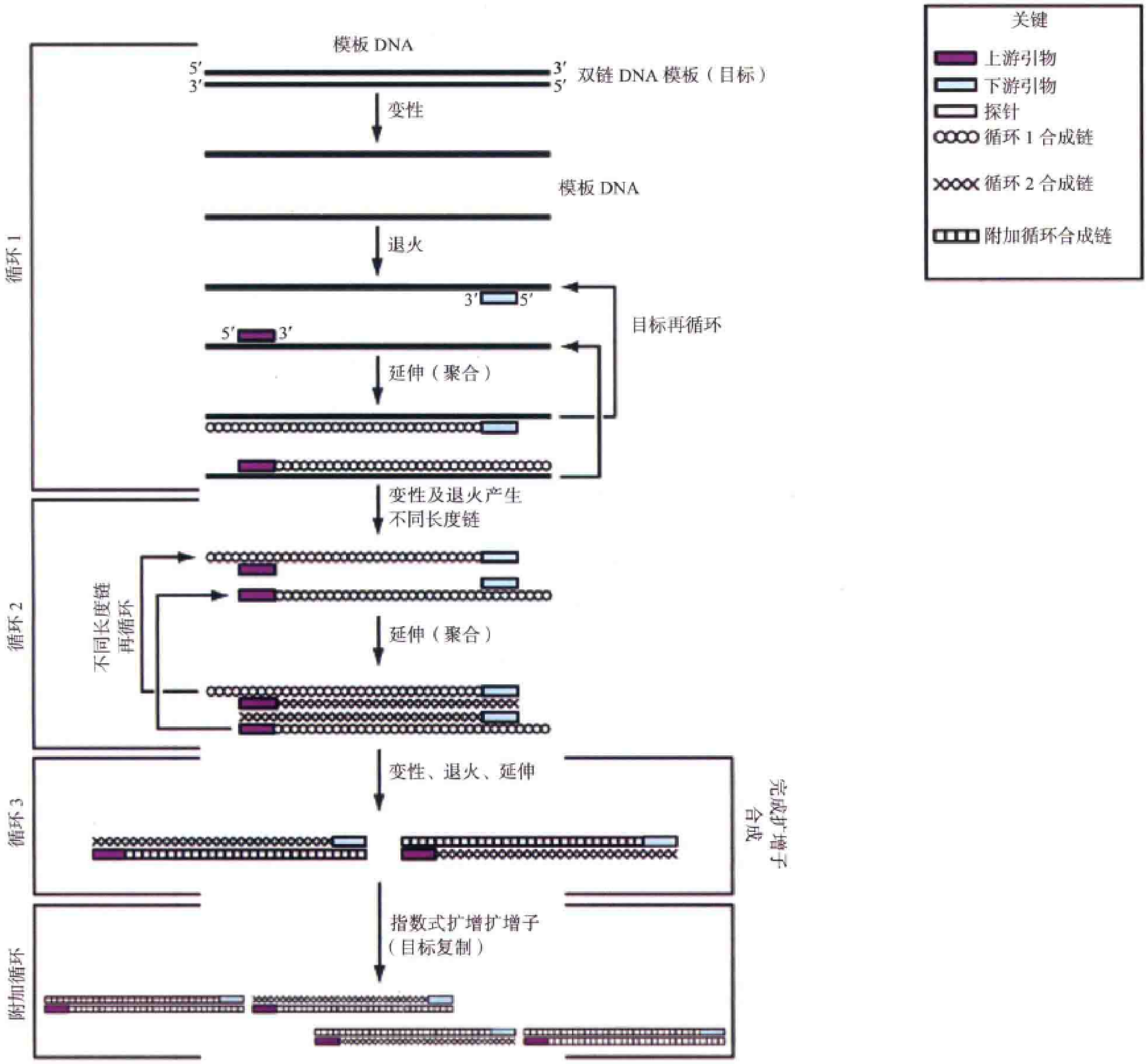

模板DNA
5′
3′
3′
5′
双链DNA模板（目标）
变性
模板DNA
退火
3′
5′
5′
3′
目标再循环
延伸（聚合）
变性及退火产生
不同长度链
不同长度链
再循环
延伸（聚合）
变性、退火、延伸
完成扩增子
合成
指数式扩增扩增子
（目标复制）
循环1
循环2
循环3
附加循环
关键
上游引物
下游引物
探针
循环1合成链
循环2合成链
附加循环合成链

图 7-5

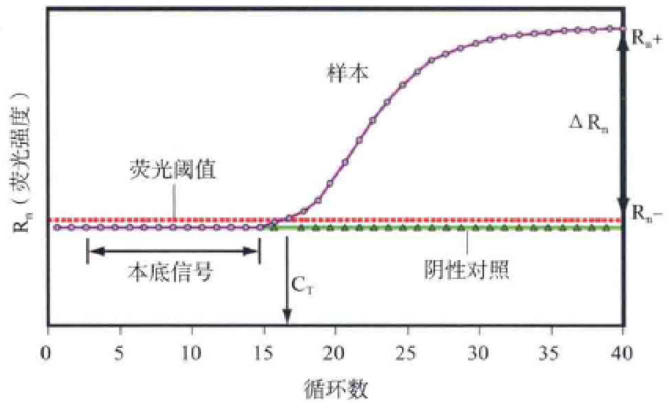

样本
荧光阈值
本底信号
阴性对照
C_T
R_n+
ΔR_n
R_n-
R_n（荧光强度）
0
5
10
15
20
25
30
35
40
循环数

图 7-6

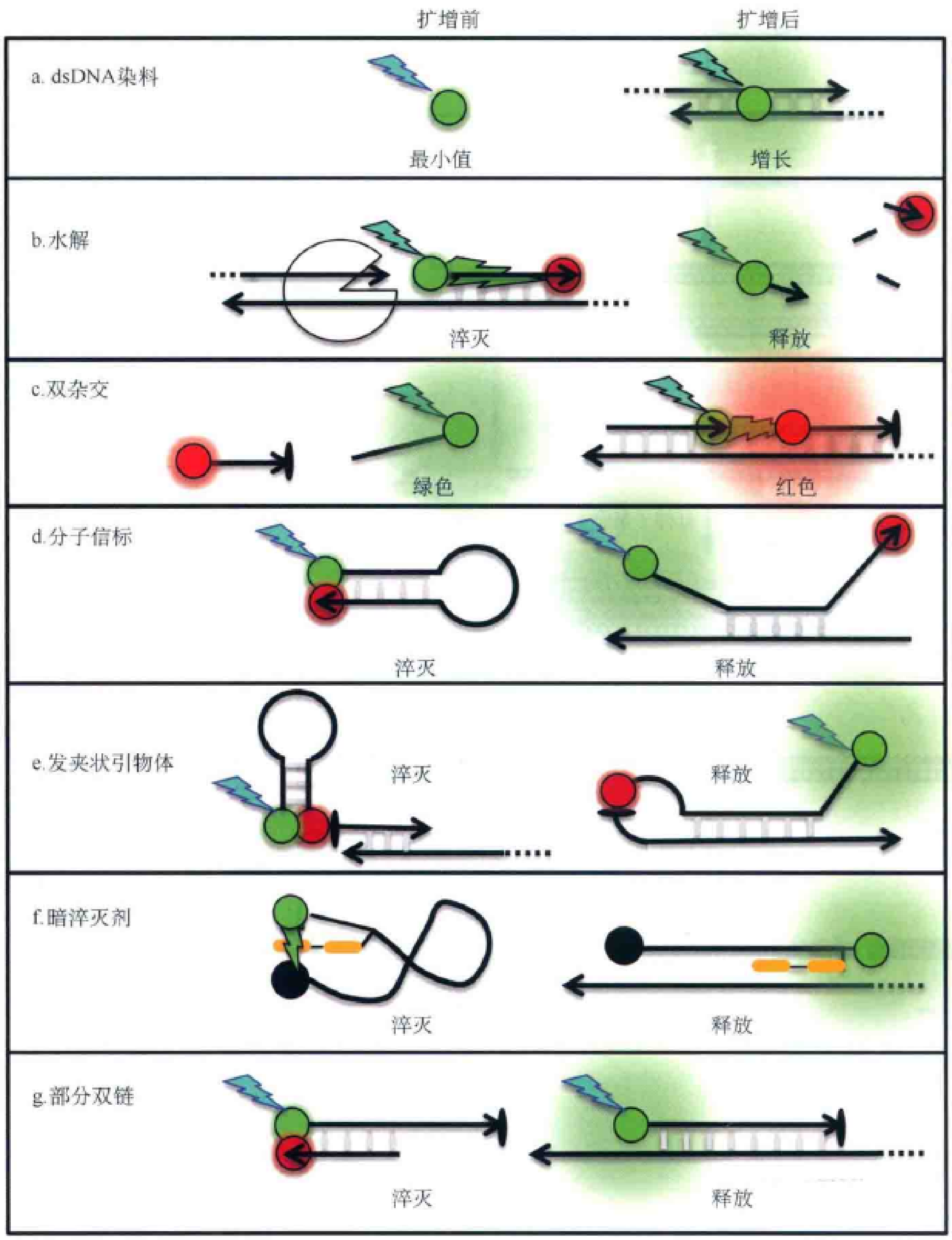

扩增前
扩增后
a. dsDNA染料
最小值
增长
b. 水解
淬灭
释放
c. 双杂交
绿色
红色
d. 分子信标
淬灭
释放
e. 发夹状引物体
淬灭
释放
f. 暗淬灭剂
淬灭
释放
g. 部分双链
淬灭
释放

图 7-7

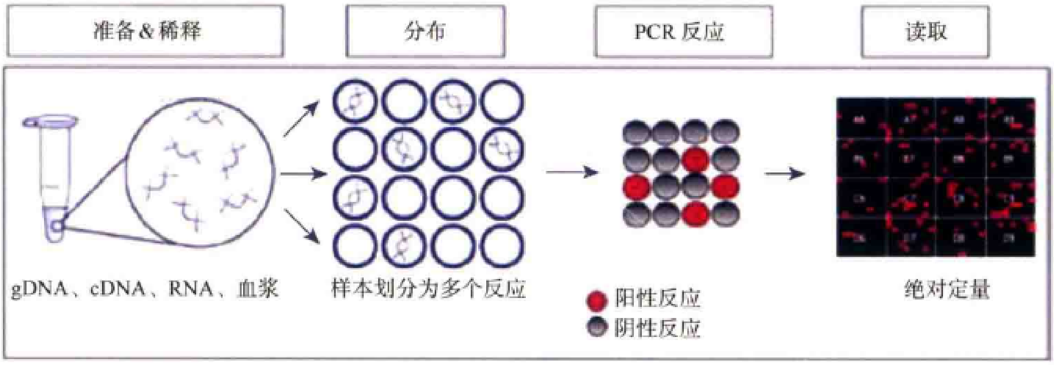

准备&稀释
分布
PCR 反应
读取
gDNA、cDNA、RNA、血浆
样本划分为多个反应
阳性反应
阴性反应
绝对定量

图 7-9

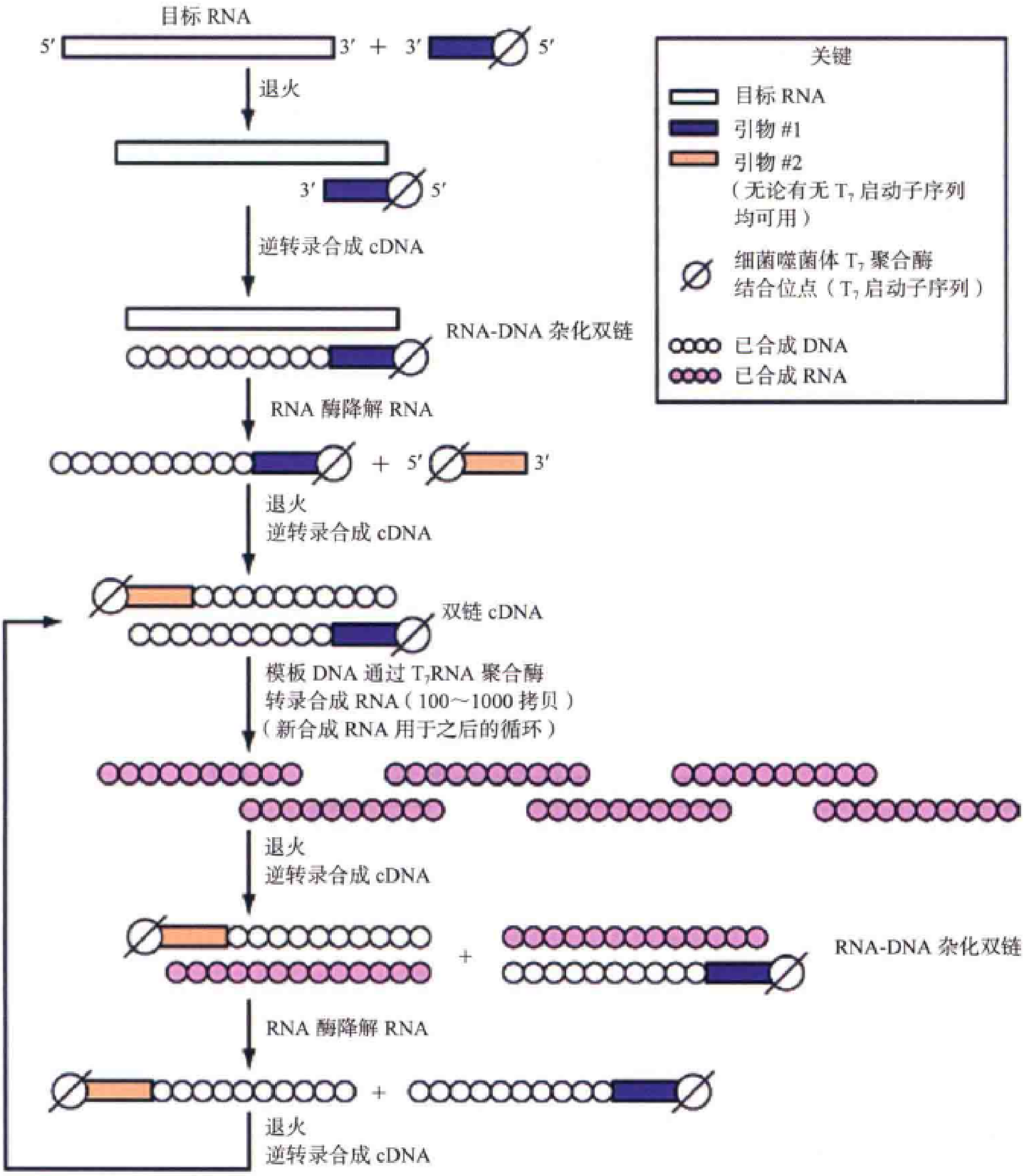
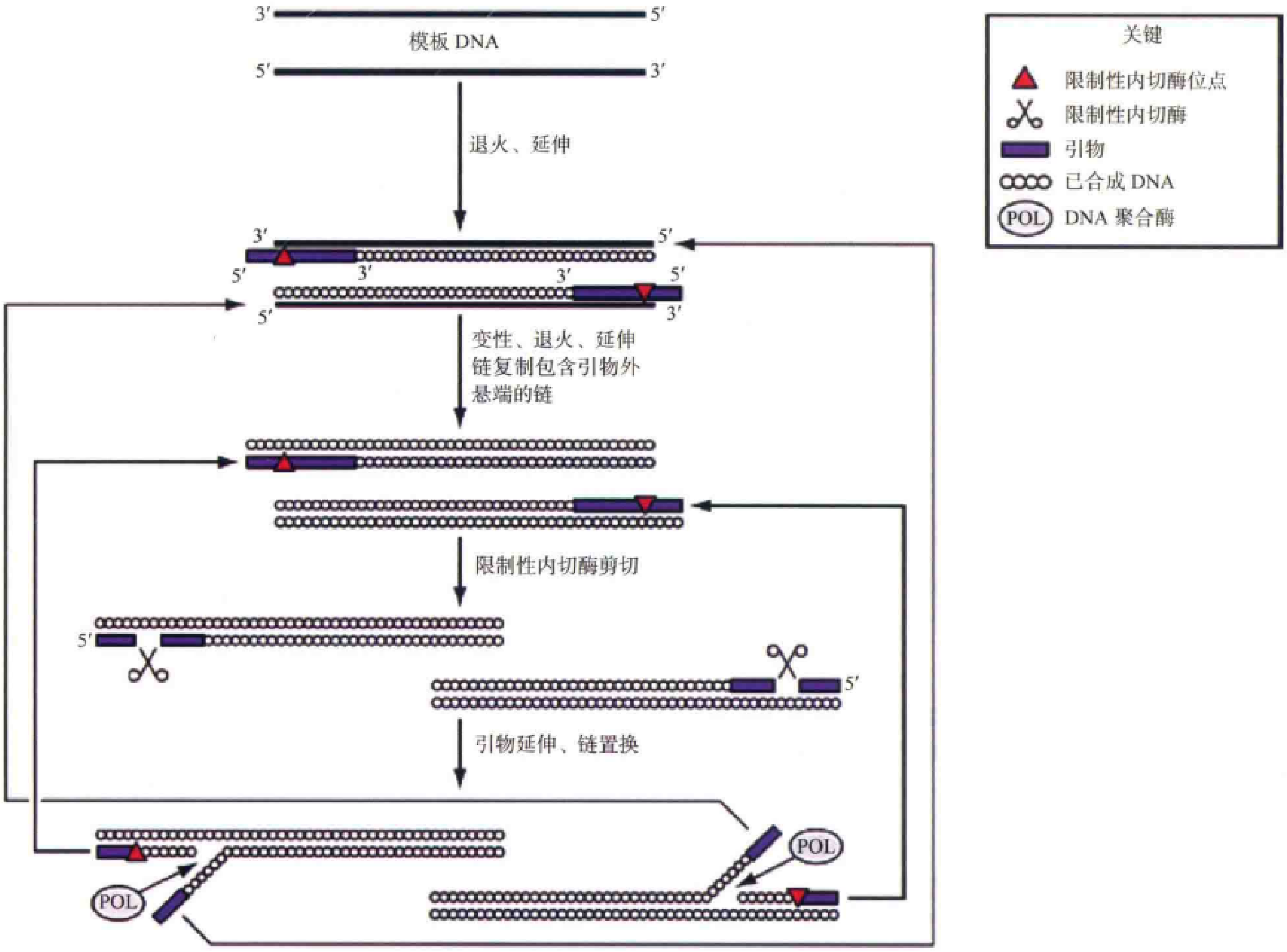

目标 RNA
5′
3′
+
3′
5′
退火
逆转录合成 cDNA
RNA-DNA 杂化双链
RNA 酶降解 RNA
退火
逆转录合成 cDNA
双链 cDNA
模板 DNA 通过 T_7RNA 聚合酶
转录合成 RNA（100～1000 拷贝）
（新合成 RNA 用于之后的循环）
退火
逆转录合成 cDNA
RNA-DNA 杂化双链
RNA 酶降解 RNA
退火
逆转录合成 cDNA
关键
目标 RNA
引物 #1
引物 #2
（无论有无 T_7 启动子序列均可用）
细菌噬菌体 T_7 聚合酶结合位点（T_7 启动子序列）
已合成 DNA
已合成 RNA

图 7-10



3′
5′
模板 DNA
5′
3′
退火、延伸
3′
5′
5′
3′
3′
5′
5′
3′
变性、退火、延伸
链复制包含引物外
悬端的链
限制性内切酶剪切
5′
5′
引物延伸、链置换
POL
POL
关键
限制性内切酶位点
限制性内切酶
引物
已合成 DNA
POL
DNA 聚合酶

图 7-11

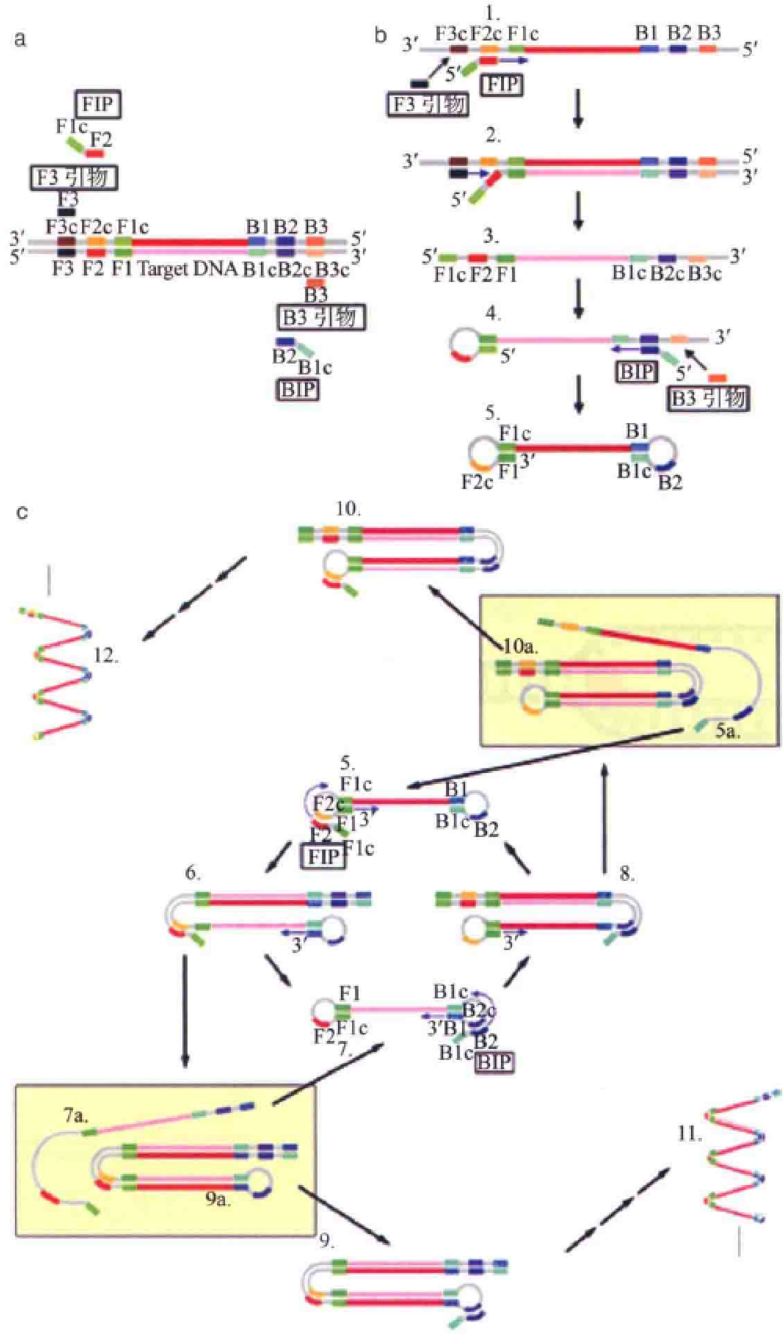
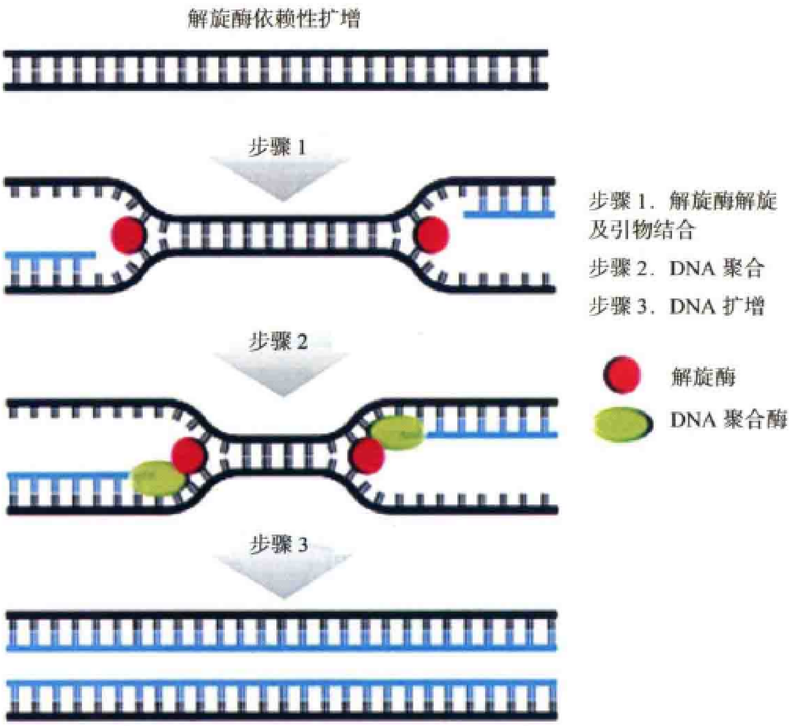

a
FIP
F1c
F2
F3 引物
F3
3′ F3c F2c F1c B1 B2 B3 5′
5′ F3 F2 F1 Target DNA B1c B2c B3c 3′
B3
B3 引物
B2 B1c
BIP
b
1.
3′ F3c F2c F1c B1 B2 B3 5′
5′
FIP
F3 引物
2.
3′ 5′ 3′
5′
3.
5′ F1c F2 F1 B1c B2c B3c 3′
4.
5′ 3′
BIP 5′
B3 引物
5.
F1c B1
F1 3′
F2c B1c B2
c
10.
10a.
5a.
12.
5.
F1c B1
F2c F1 3′
F2 F1c B1c B2
FIP
6.
8.
3′
3′
F1 B1c
B2c
F2 F1c 3′B1 B2
7.
B1c BIP
7a.
9a.
11.
9.

图 7-12



解旋酶依赖性扩增
步骤1
步骤2
步骤3
步骤1. 解旋酶解旋及引物结合
步骤2. DNA 聚合
步骤3. DNA 扩增
解旋酶
DNA 聚合酶

图 7-13

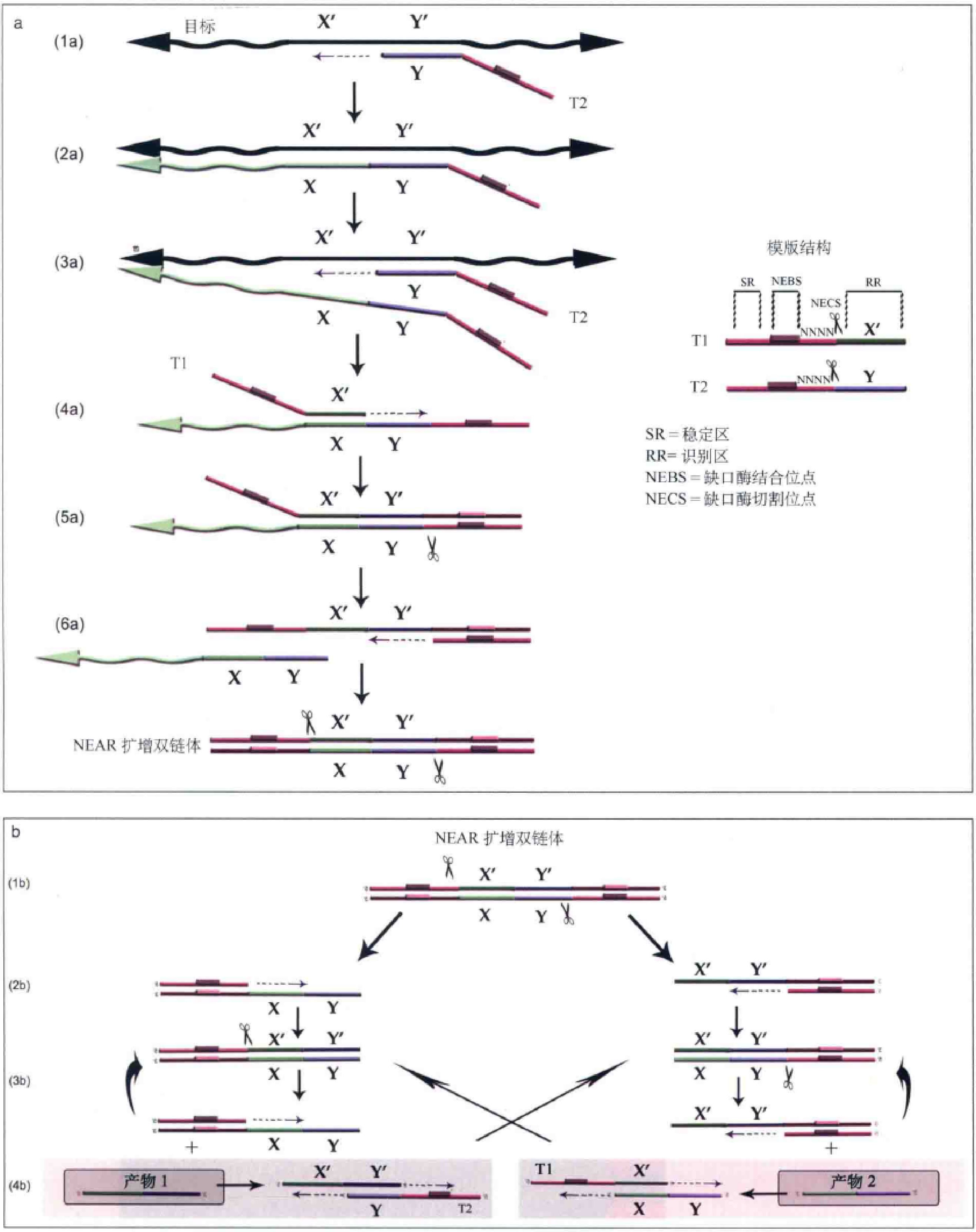

a
(1a)
目标
X′
Y′
Y
T2
(2a)
X
(3a)
T1
(4a)
(5a)
(6a)
NEAR 扩增双链体
模版结构
SR
NEBS
NECS
RR
NNNN
SR＝稳定区
RR= 识别区
NEBS＝缺口酶结合位点
NECS＝缺口酶切割位点
b
(1b)
(2b)
(3b)
(4b)
产物 1
产物 2
+

图 7-14

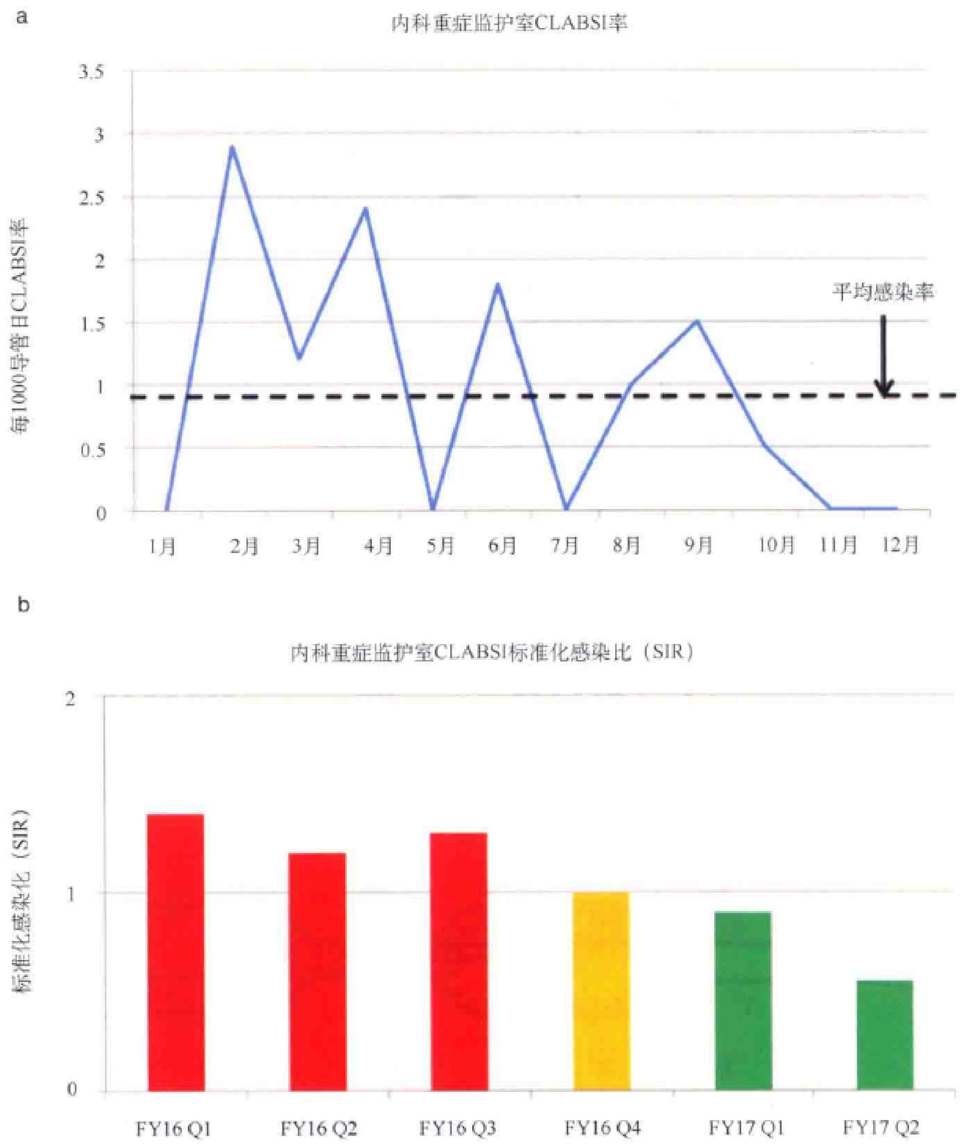

a
内科重症监护室CLABSI率
每1000导管日CLABSI率
平均感染率
1月
2月
3月
4月
5月
6月
7月
8月
9月
10月
11月
12月
b
内科重症监护室CLABSI标准化感染比（SIR）
标准化感染比（SIR）
FY16 Q1
FY16 Q2
FY16 Q3
FY16 Q4
FY17 Q1
FY17 Q2

图 9-1

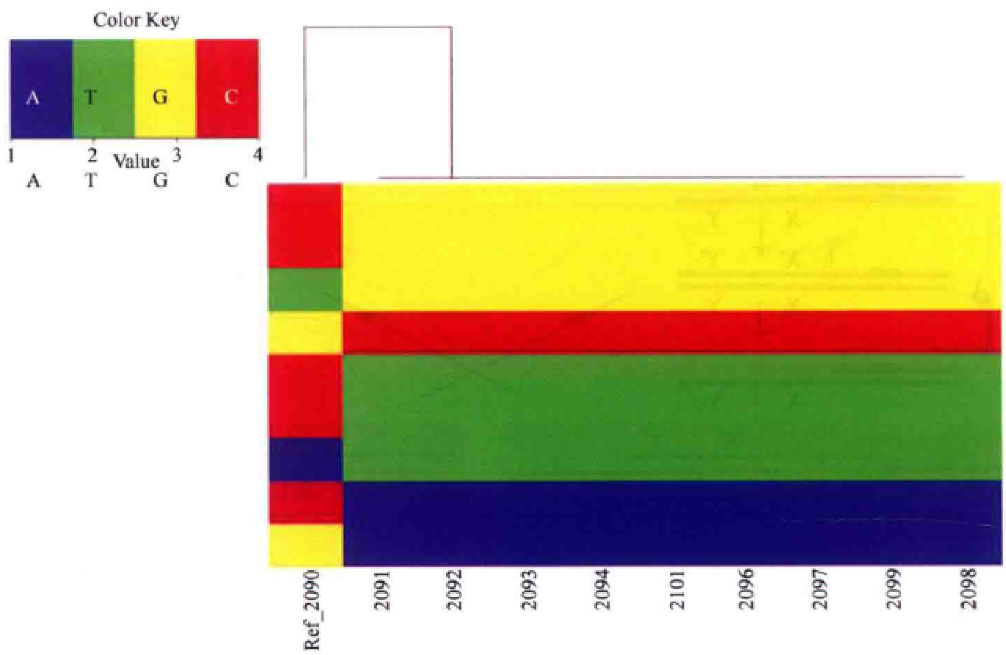

Color Key
A
T
G
C
Value
Ref_2090
2091
2092
2093
2094
2101
2096
2097
2099
2098

图 11-4

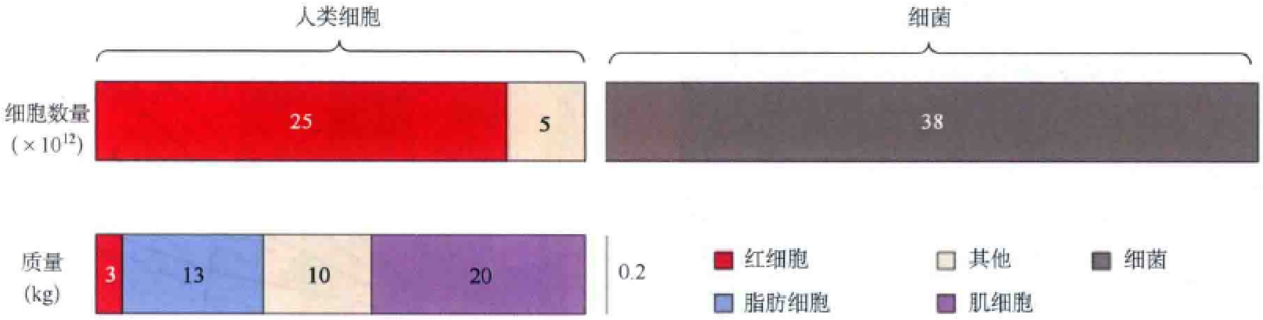

人类细胞
细菌
细胞数量 (×10^12)
25
5
38
质量 (kg)
3
13
10
20
0.2
红细胞
其他
细菌
脂肪细胞
肌细胞

图 16-1

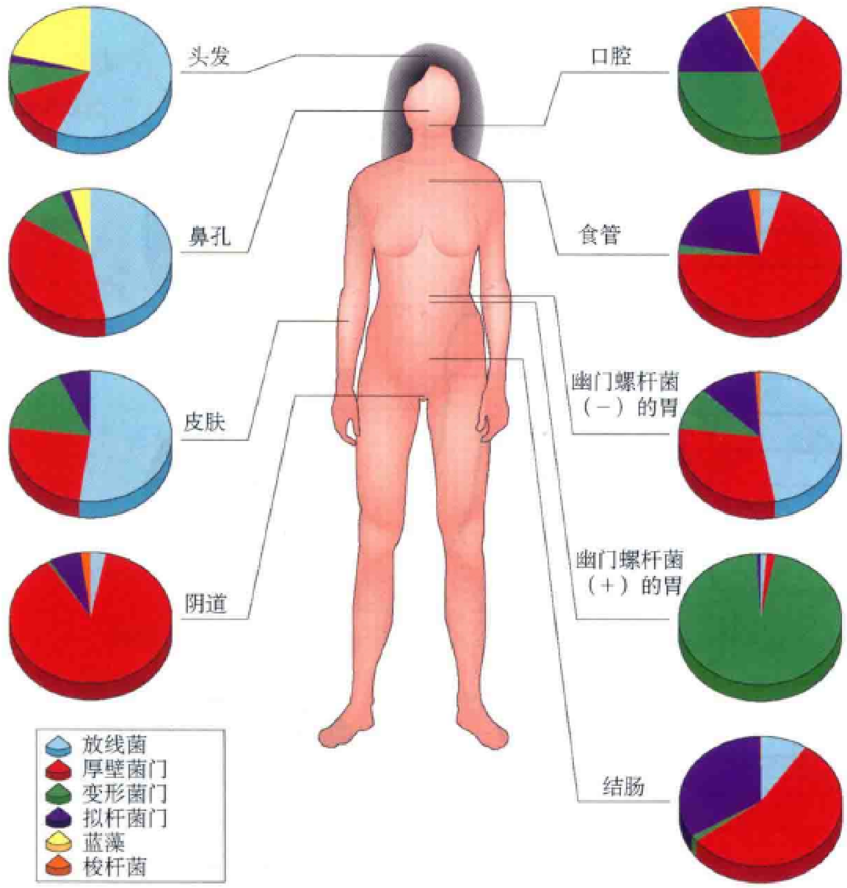

头发
口腔
鼻孔
食管
皮肤
幽门螺杆菌（−）的胃
阴道
幽门螺杆菌（+）的胃
结肠
放线菌
厚壁菌门
变形菌门
拟杆菌门
蓝藻
梭杆菌

图 16-2

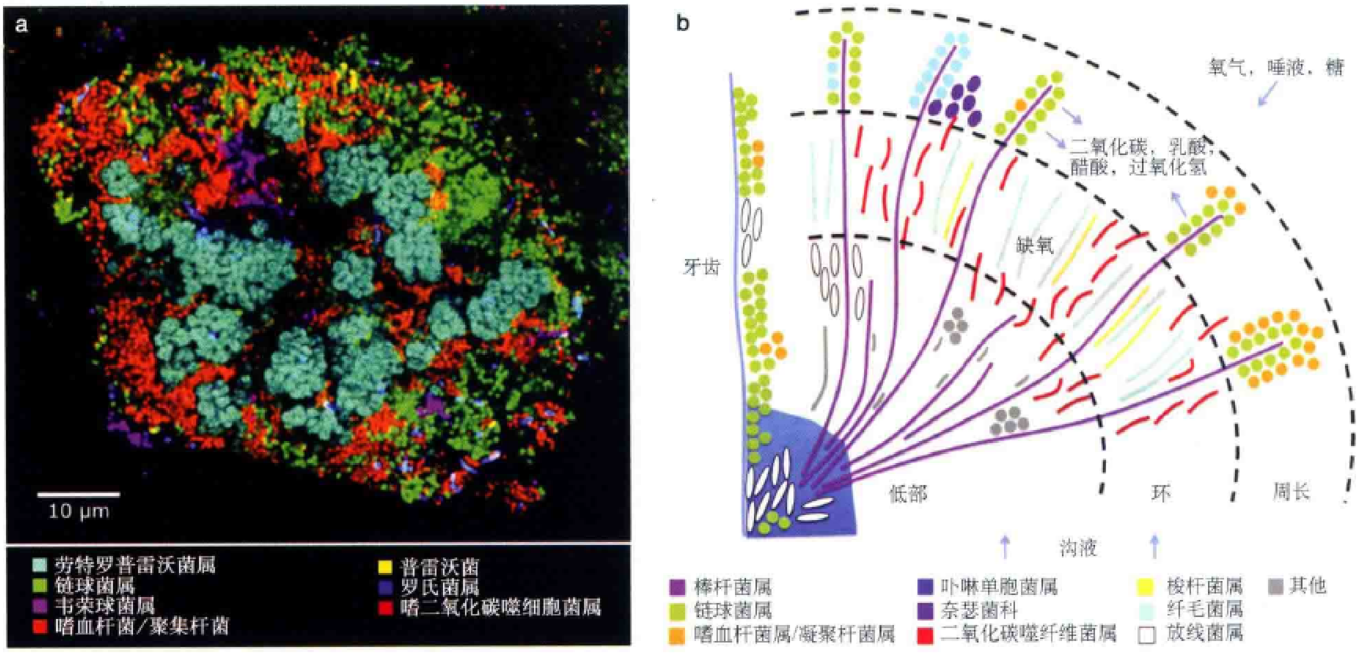

a
10 μm
劳特罗普雷沃菌属
链球菌属
韦荣球菌属
嗜血杆菌/聚集杆菌
普雷沃菌
罗氏菌属
嗜二氧化碳噬细胞菌属
b
氧气，唾液，糖
二氧化碳，乳酸，醋酸，过氧化氢
缺氧
牙齿
低部
环
周长
沟液
棒杆菌属
链球菌属
嗜血杆菌属/凝聚杆菌属
卟啉单胞菌属
奈瑟菌科
二氧化碳噬纤维菌属
梭杆菌属
纤毛菌属
放线菌属
其他

图 16-3

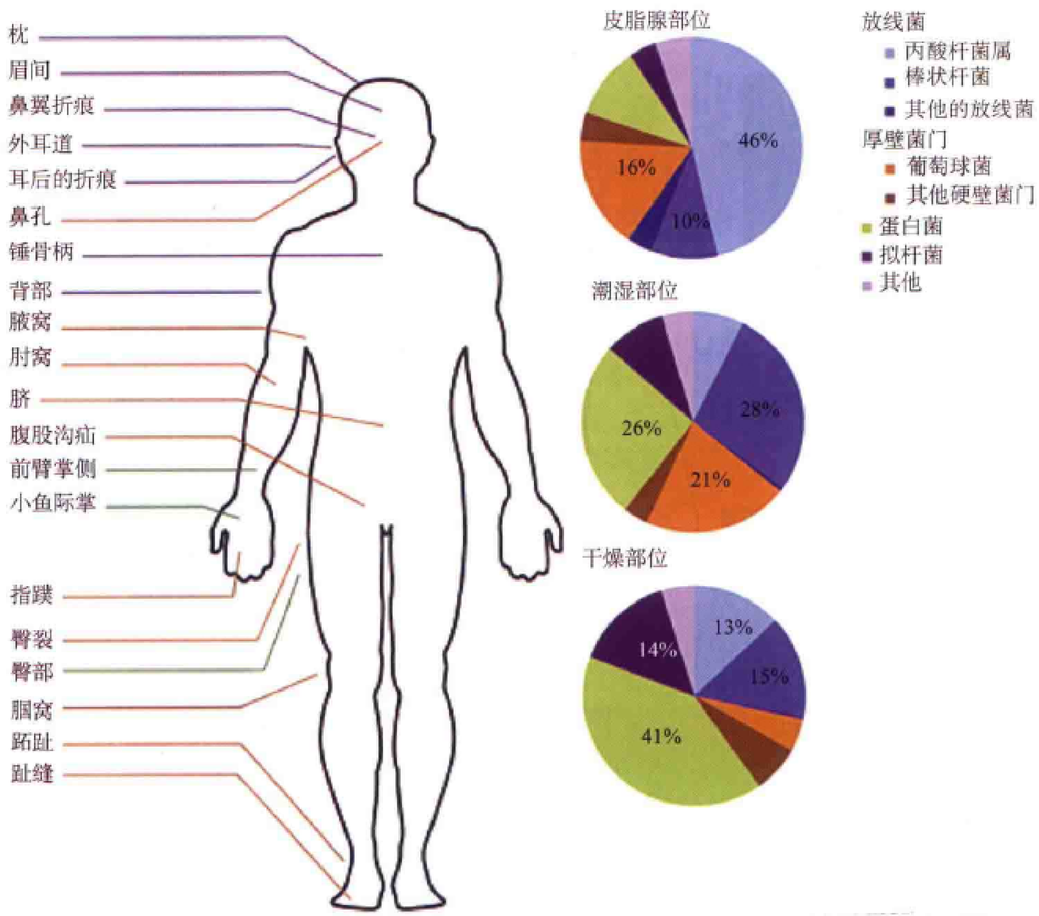

枕
眉间
鼻翼折痕
外耳道
耳后的折痕
鼻孔
锤骨柄
背部
腋窝
肘窝
脐
腹股沟疝
前臂掌侧
小鱼际掌
指蹼
臀裂
臀部
腘窝
跖趾
趾缝
皮脂腺部位
46%
16%
10%
潮湿部位
28%
26%
21%
干燥部位
13%
14%
15%
41%
放线菌
丙酸杆菌属
棒状杆菌
其他的放线菌
厚壁菌门
葡萄球菌
其他硬壁菌门
蛋白菌
拟杆菌
其他

图 16-4

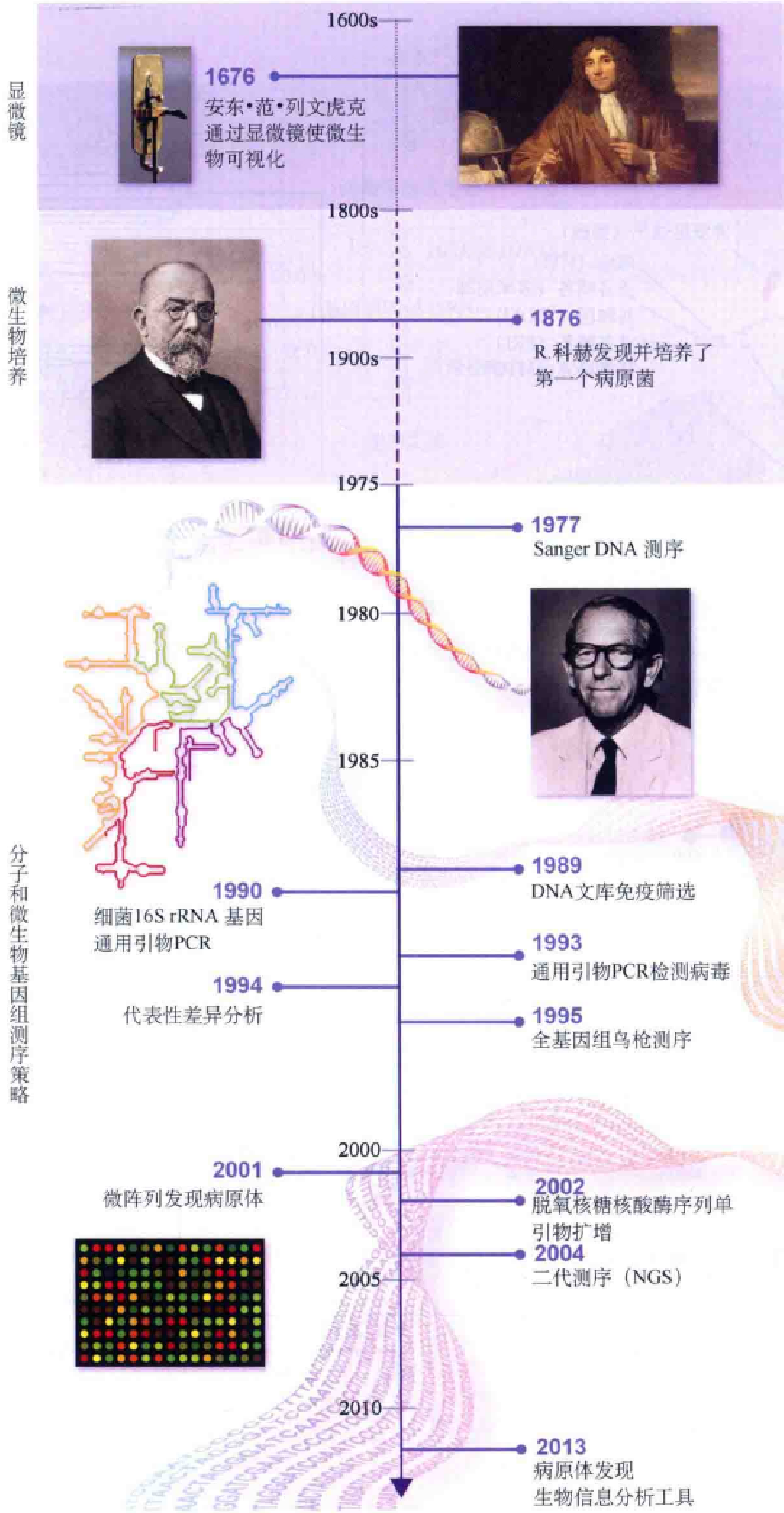
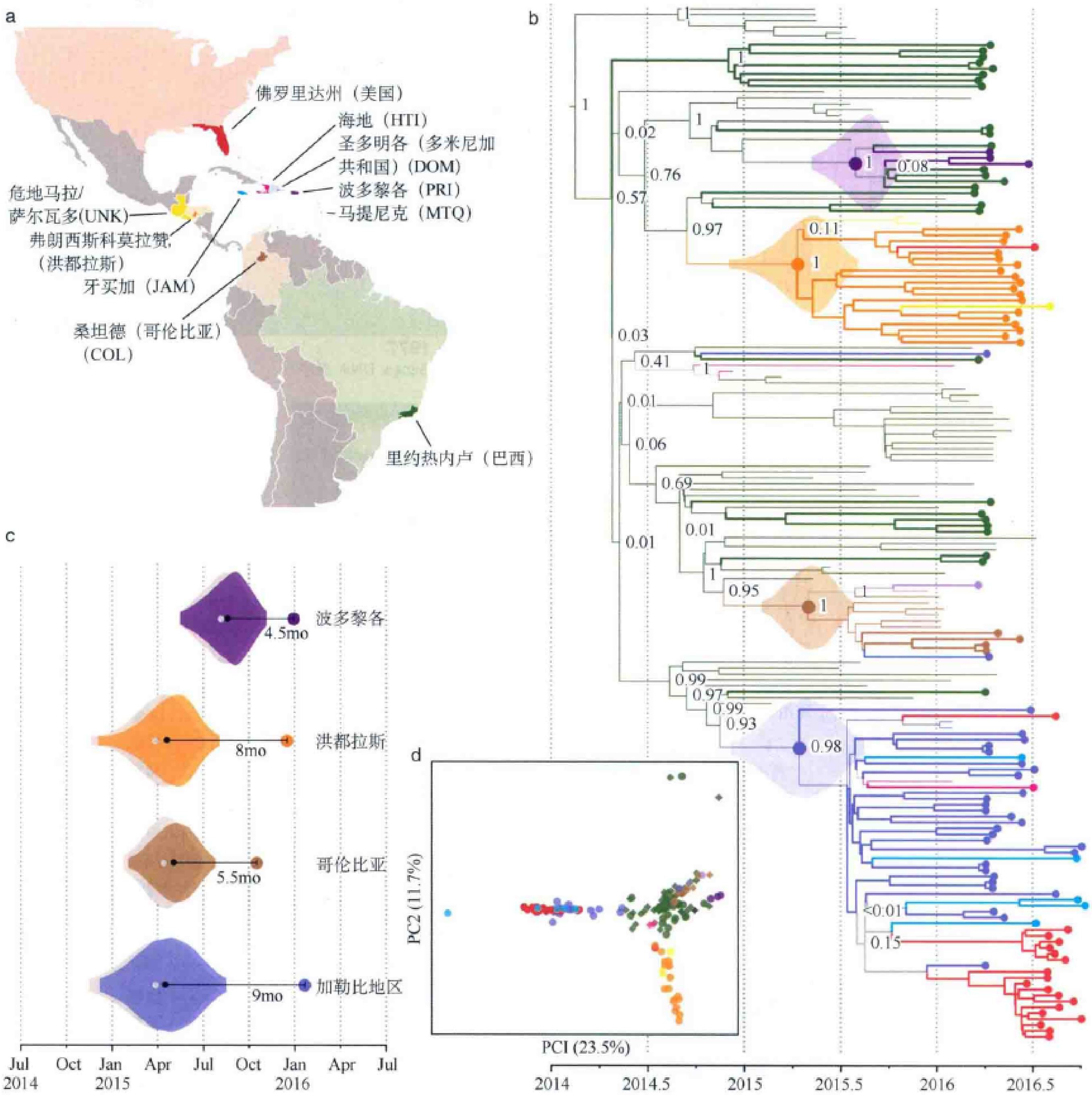

显微镜
微生物培养
分子和微生物基因组测序策略
1600s
1676
安东·范·列文虎克通过显微镜使微生物可视化
1800s
1876
R.科赫发现并培养了第一个病原菌
1900s
1975
1977
Sanger DNA 测序
1980
1985
1989
DNA文库免疫筛选
1990
细菌16S rRNA 基因通用引物PCR
1993
通用引物PCR检测病毒
1994
代表性差异分析
1995
全基因组鸟枪测序
2000
2001
微阵列发现病原体
2002
脱氧核糖核酸酶序列单引物扩增
2004
二代测序（NGS）
2005
2010
2013
病原体发现生物信息分析工具

图 17-1



a
佛罗里达州（美国）
海地（HTI）
圣多明各（多米尼加共和国）(DOM)
波多黎各（PRI）
马提尼克（MTQ）
危地马拉/萨尔瓦多(UNK)
弗朗西斯科莫拉赞（洪都拉斯）
牙买加（JAM）
桑坦德（哥伦比亚）(COL)
里约热内卢（巴西）
b
c
波多黎各
4.5mo
洪都拉斯
8mo
哥伦比亚
5.5mo
加勒比地区
9mo
Jul 2014
Oct
Jan 2015
Apr
Jul
Oct
Jan 2016
Apr
Jul
d
PC2 (11.7%)
PC1 (23.5%)
2014
2014.5
2015
2015.5
2016
2016.5

图 17-2

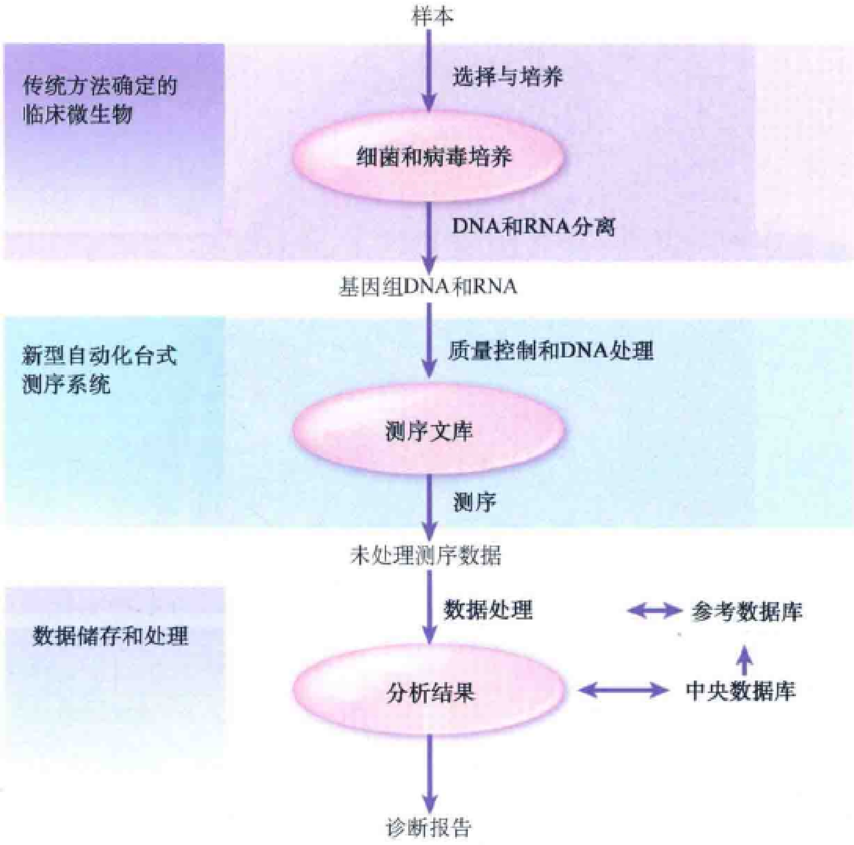


图 17-3

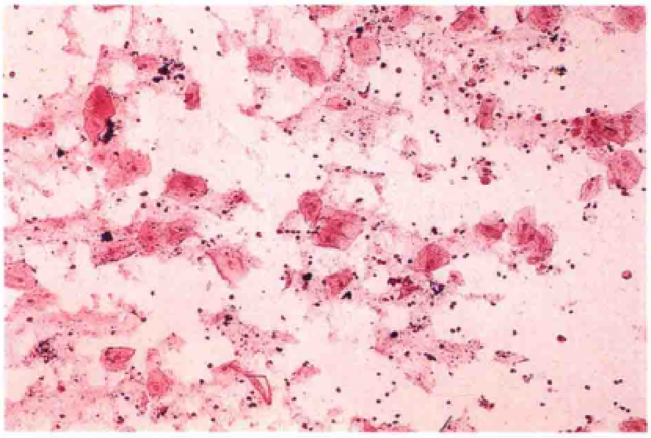


图 19-1

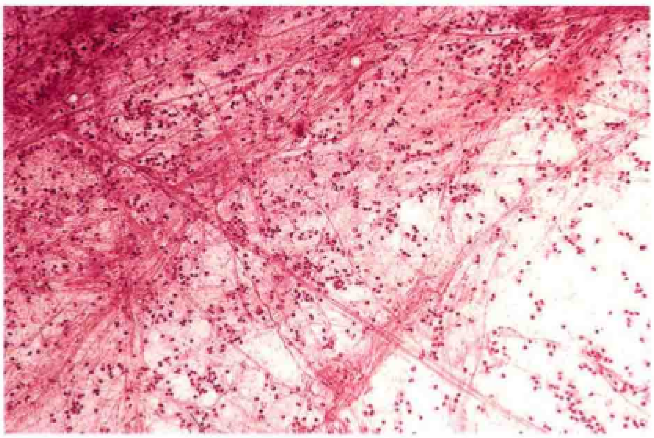


图 19-2

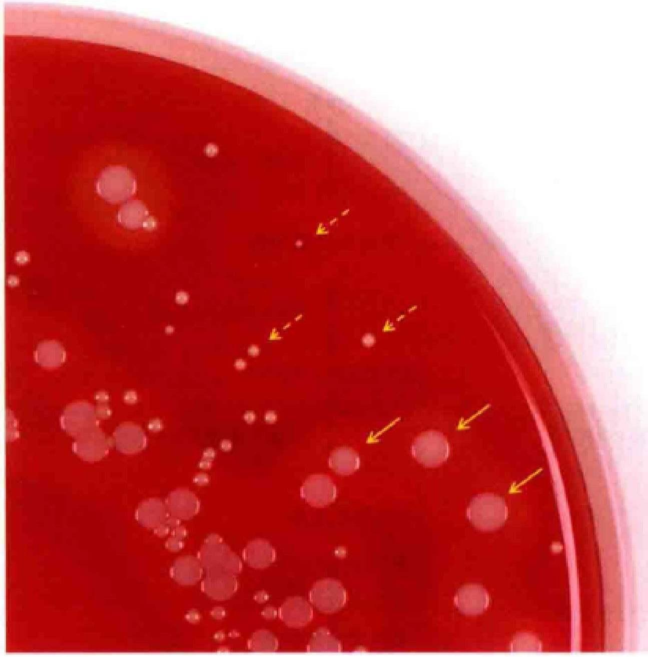


图 22-1

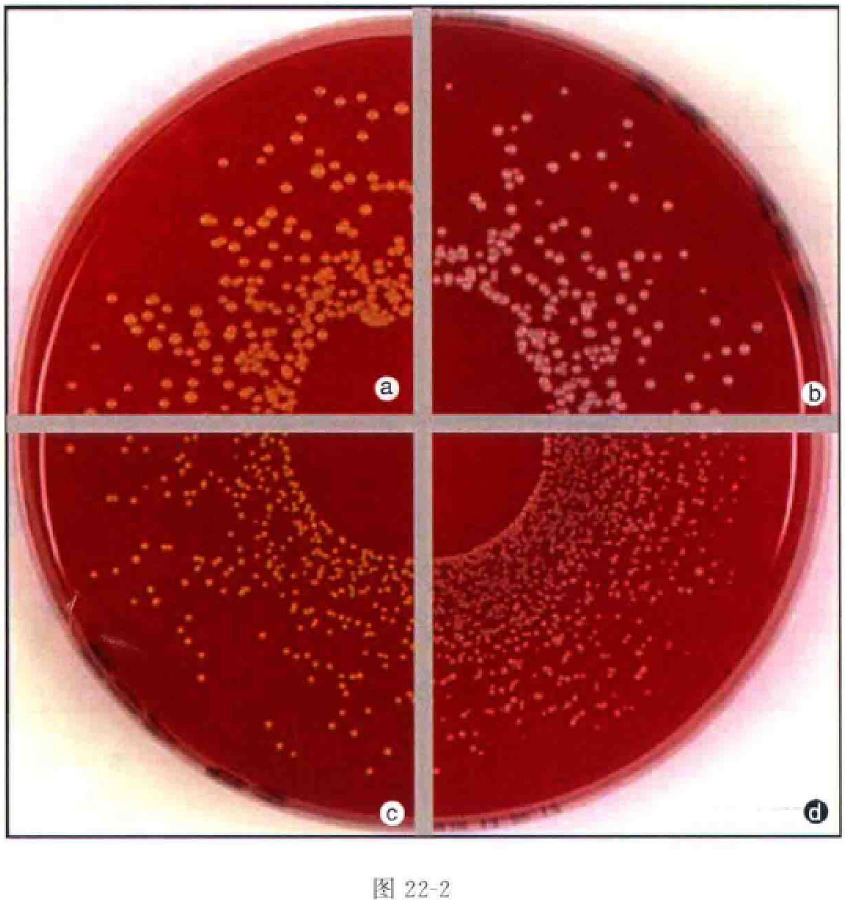


图 22-2

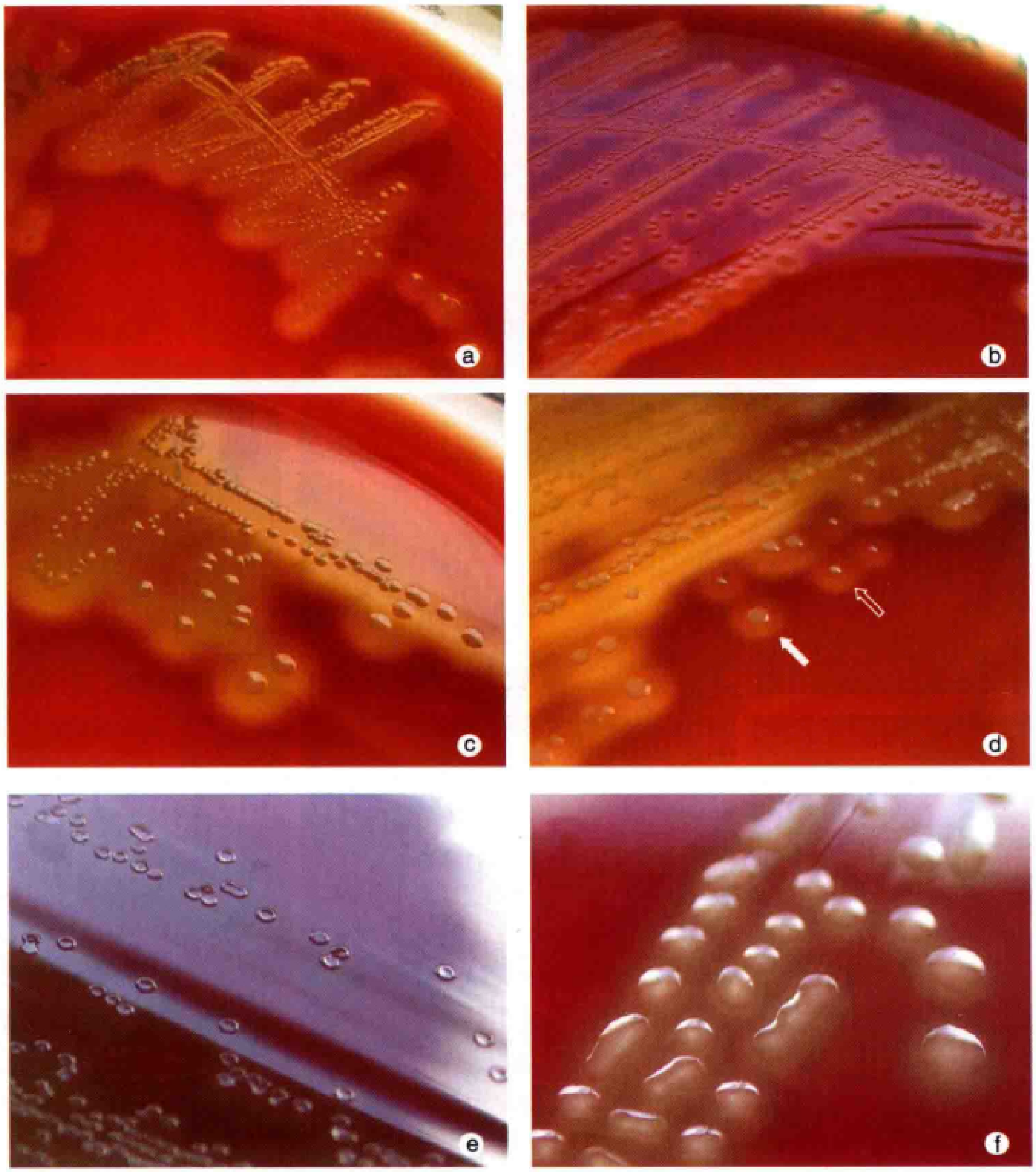


图 23-1

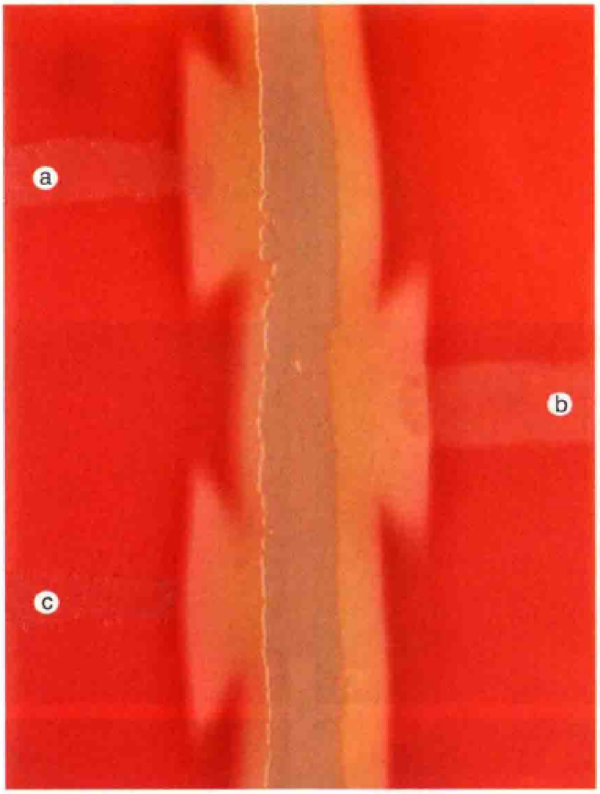


图 23-2

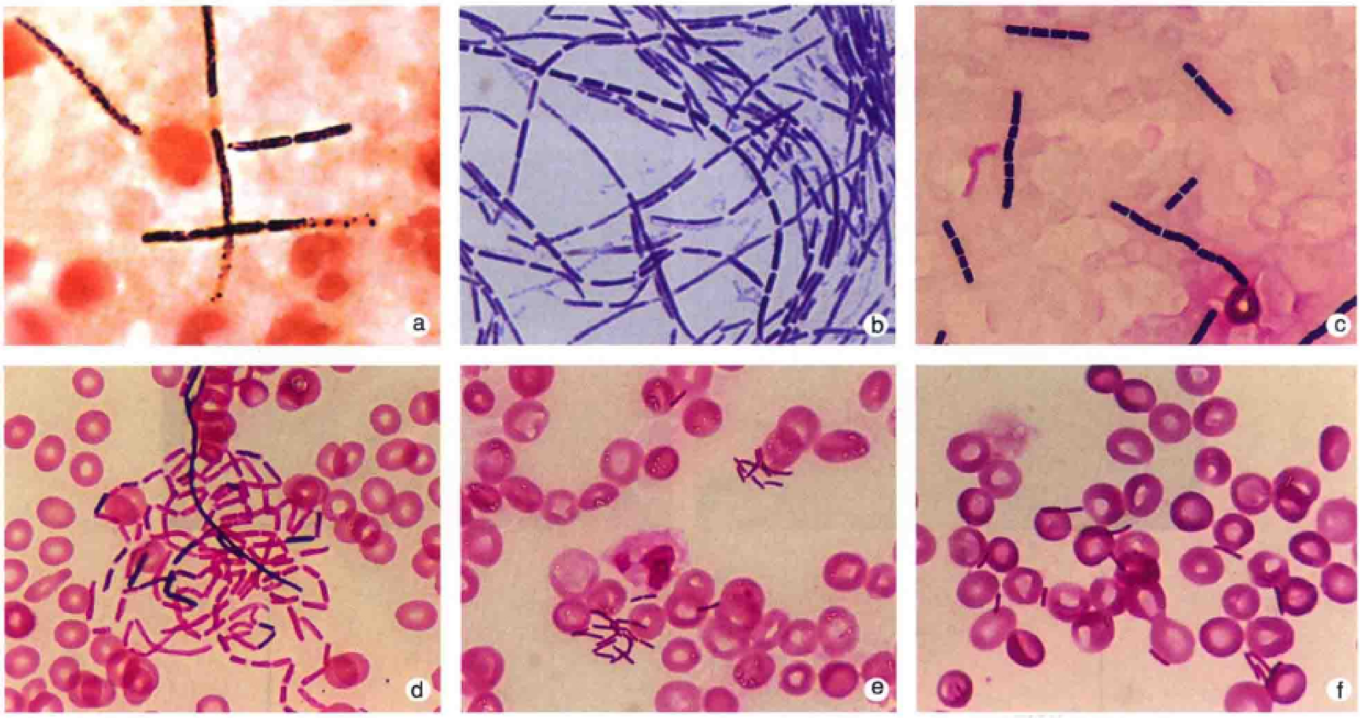


图 27-1

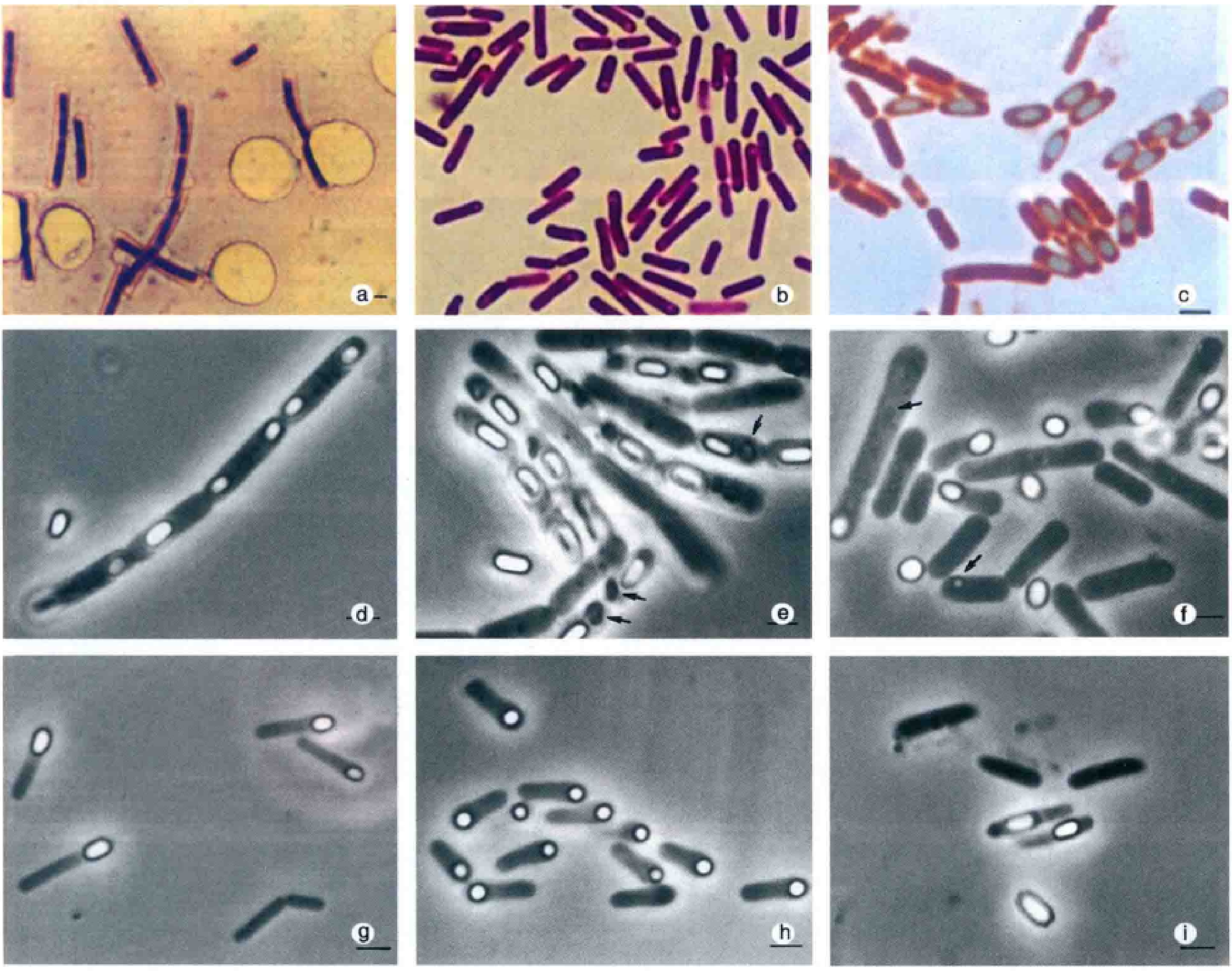


图 27-2

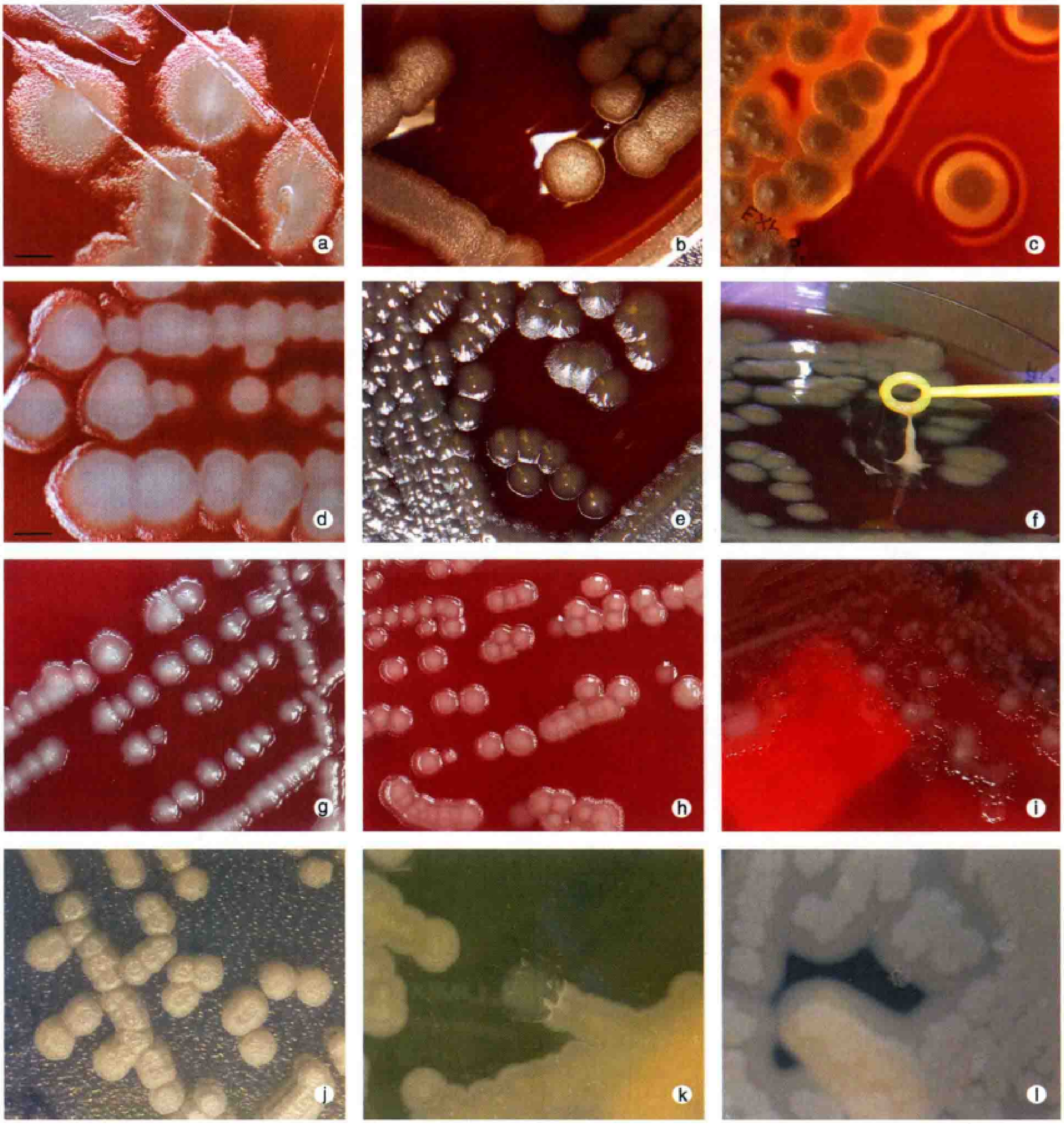


图 27-3

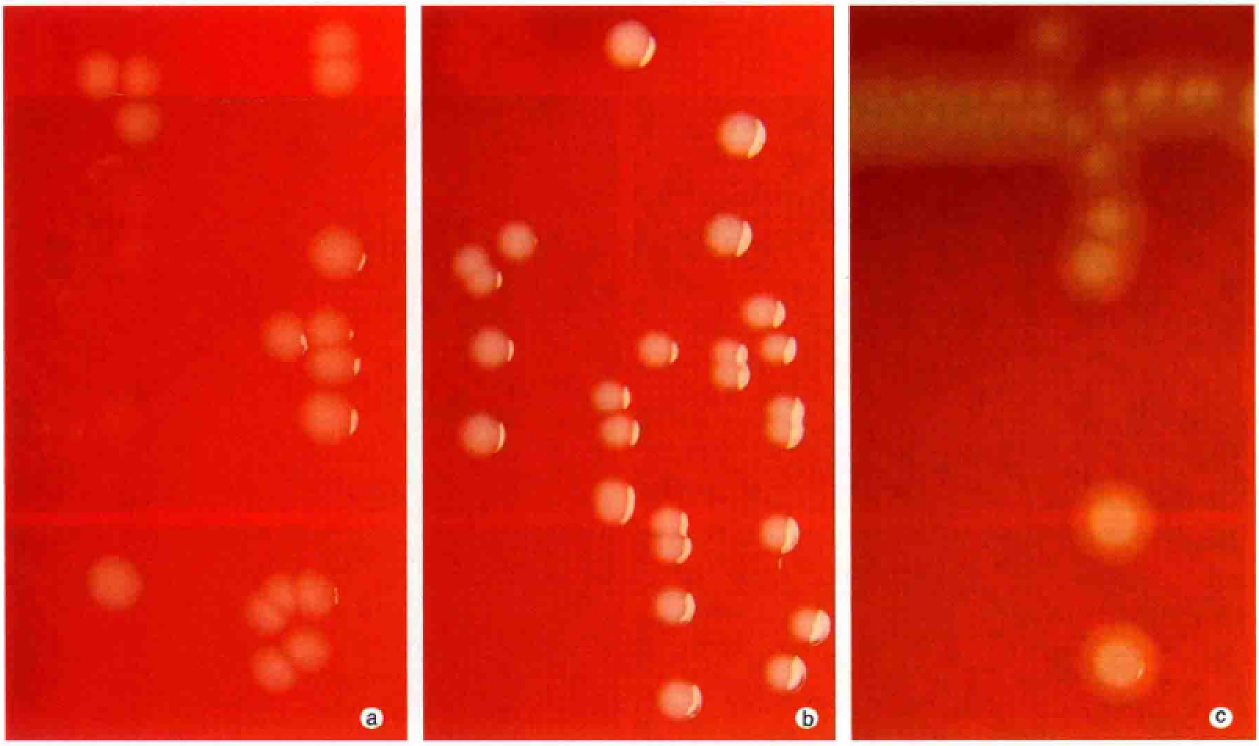


图 28-1

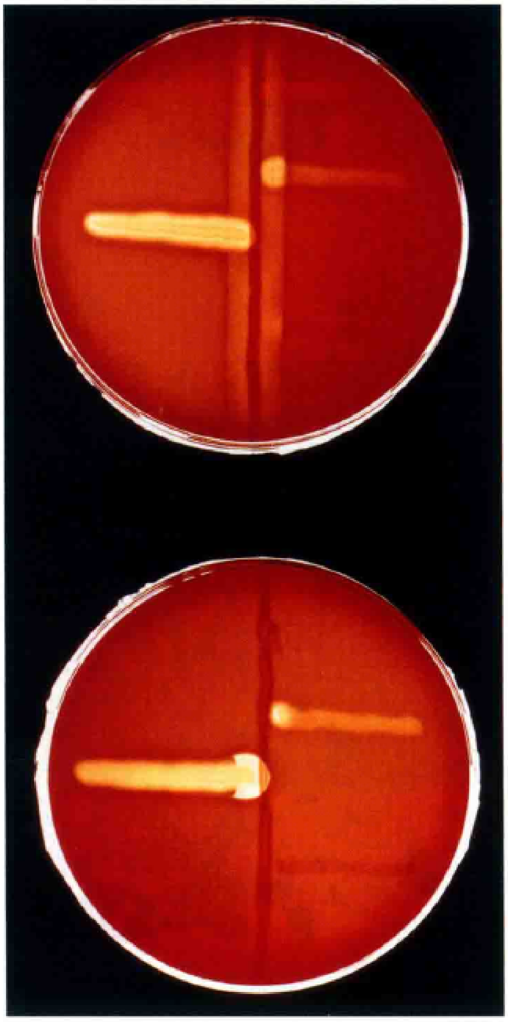


图 28-2

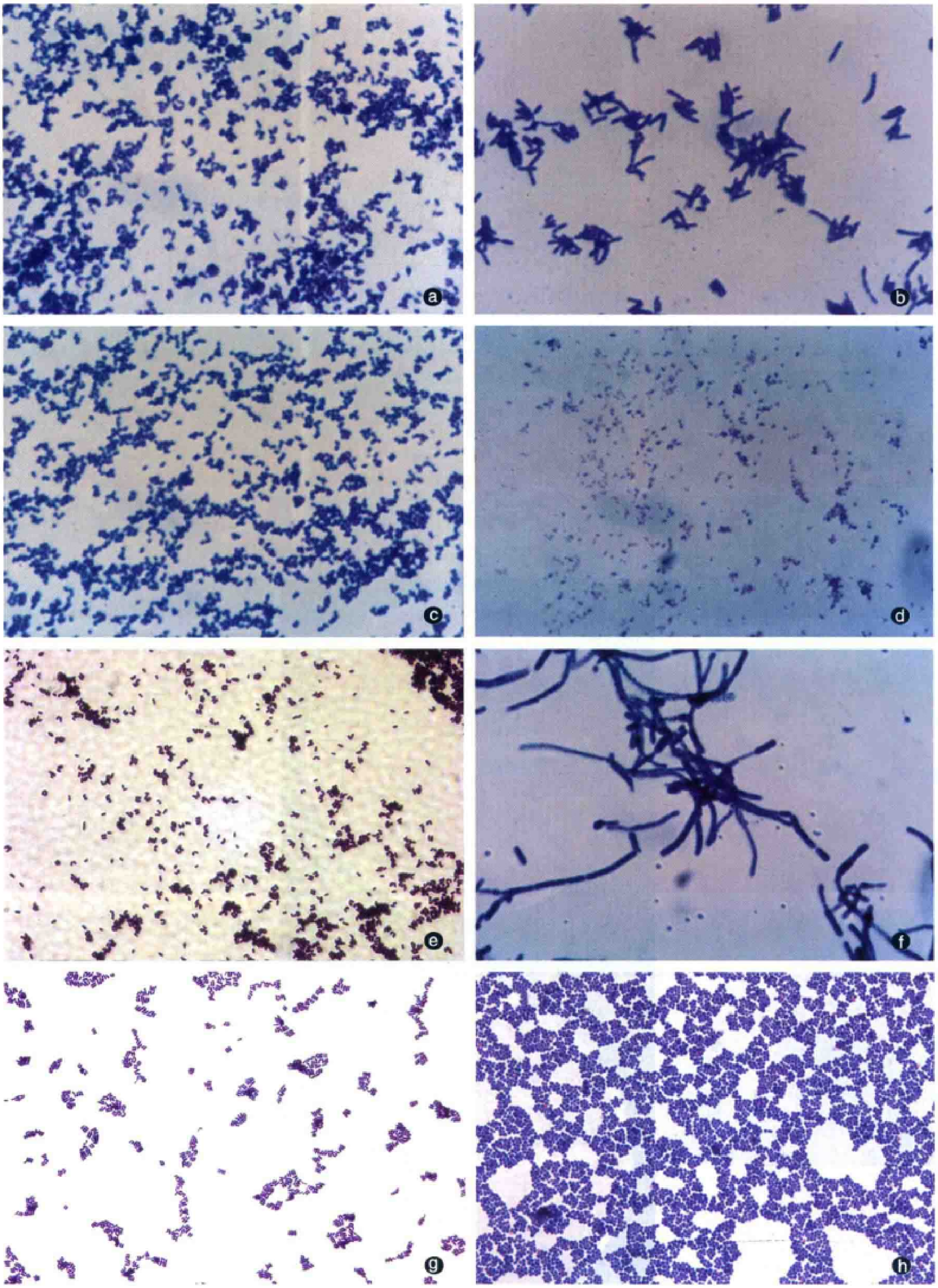


图 29-1

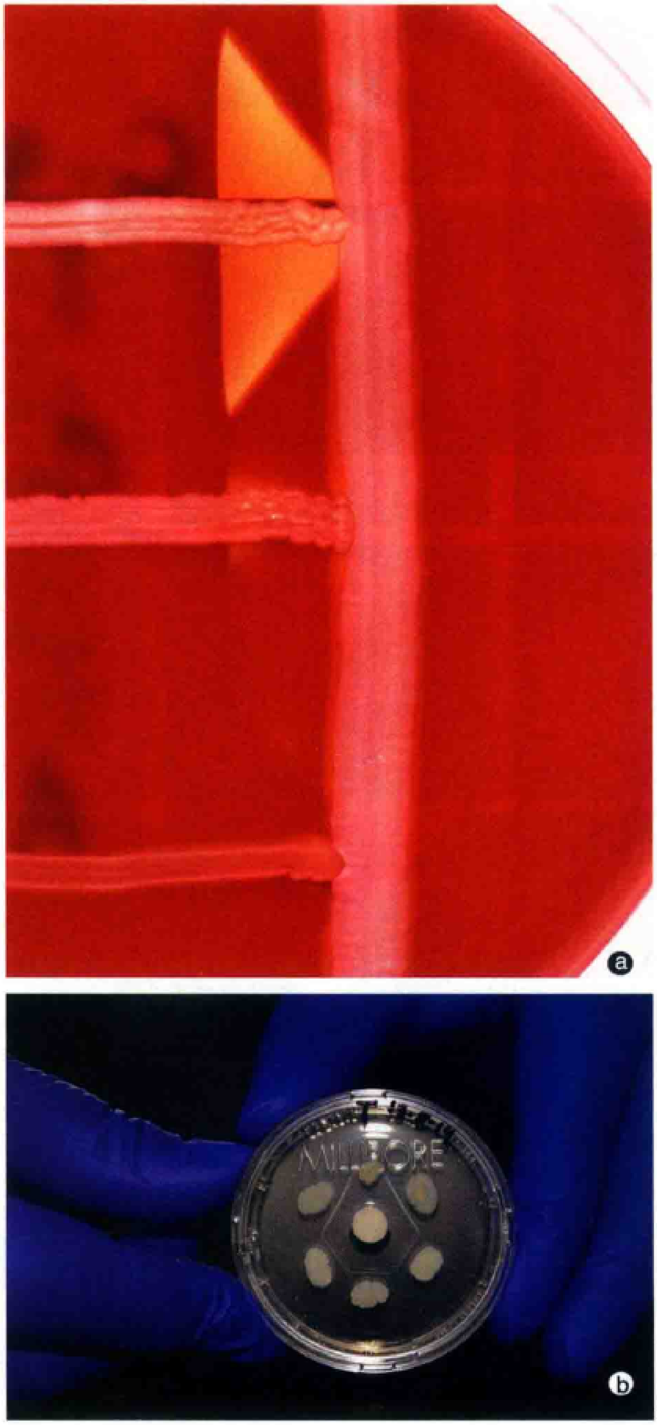


图 29-3

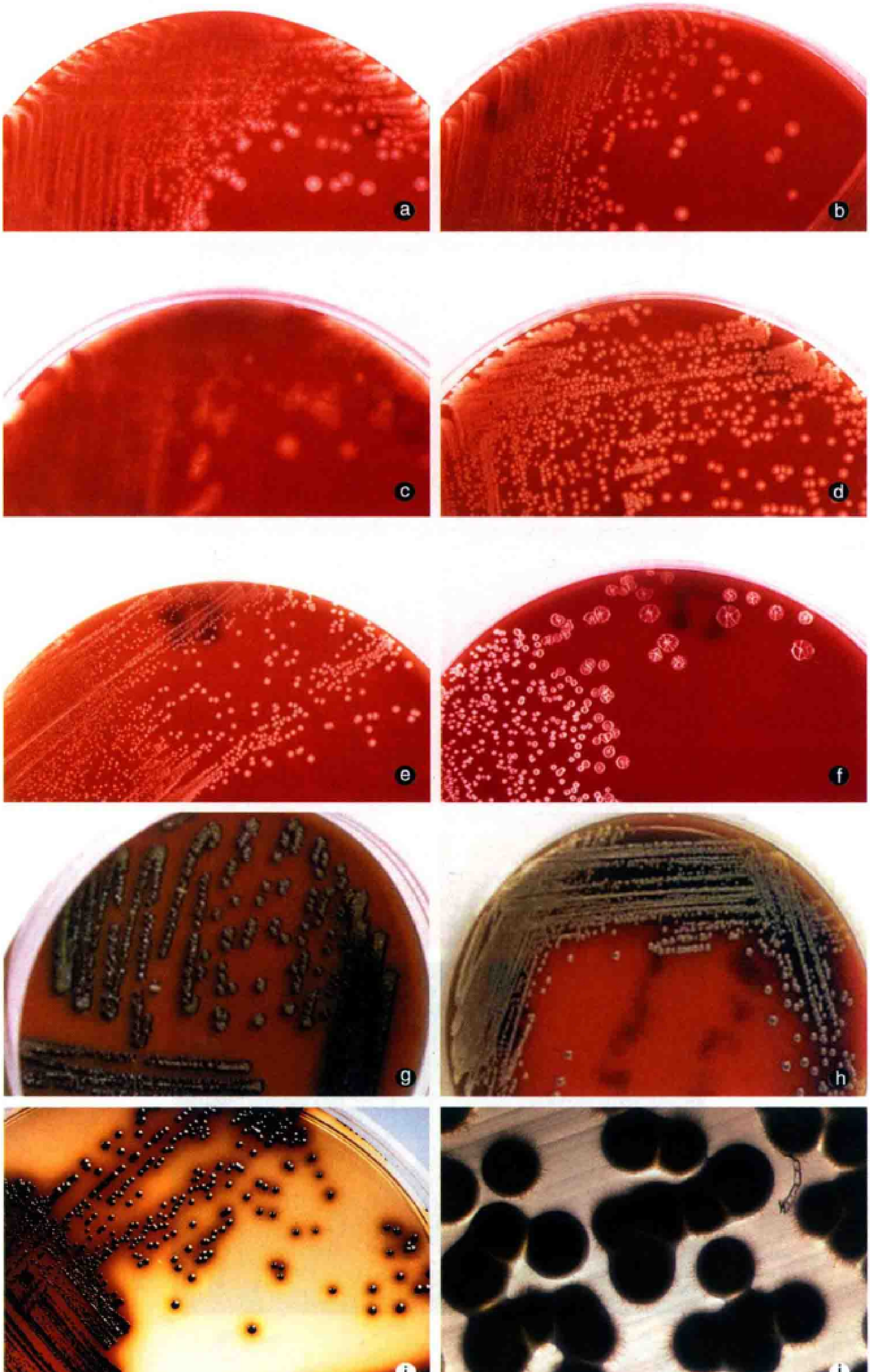


图 29-4

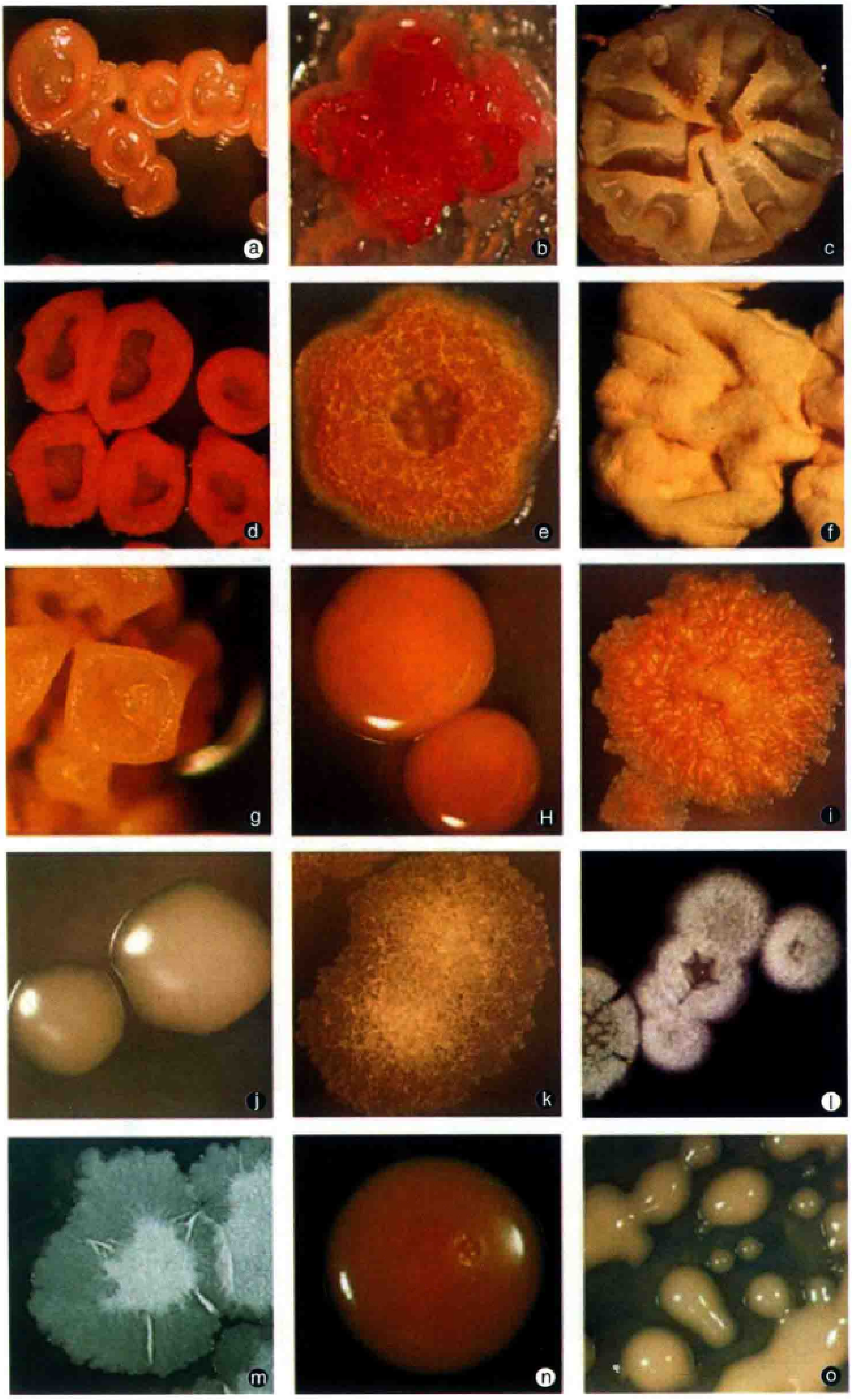


图 30-2

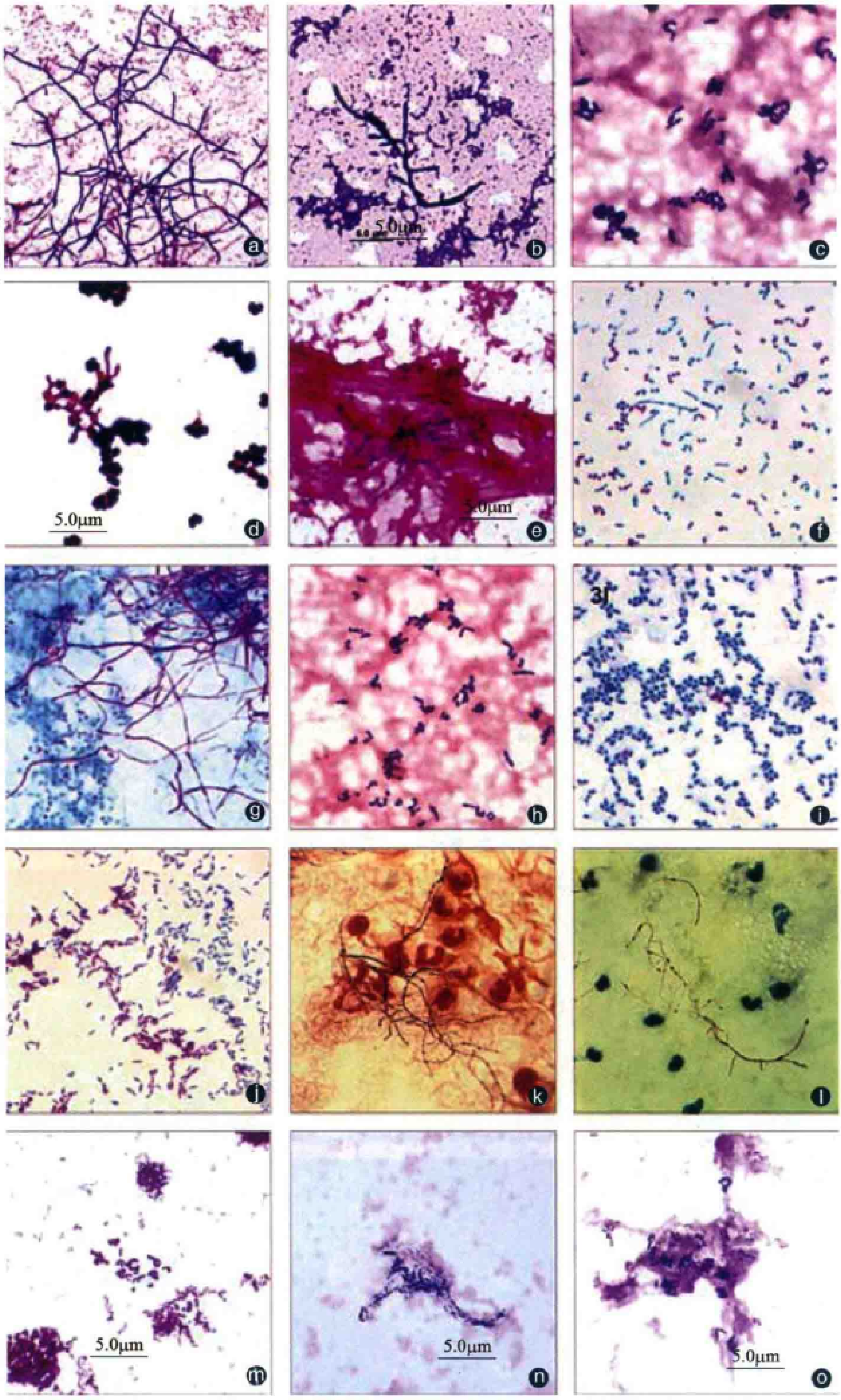


图 30-3

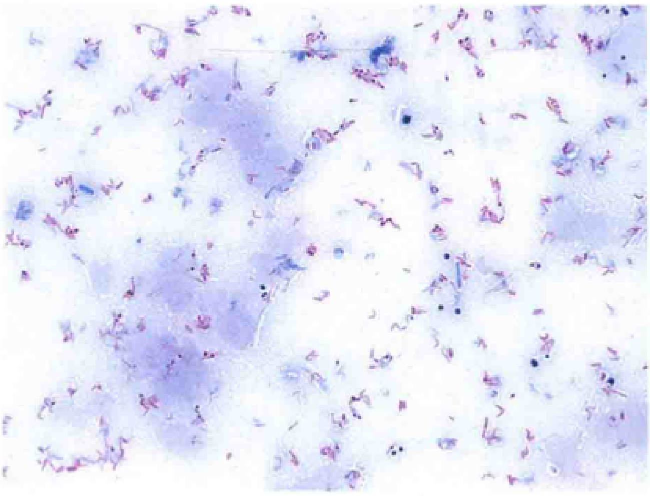


图 31-1

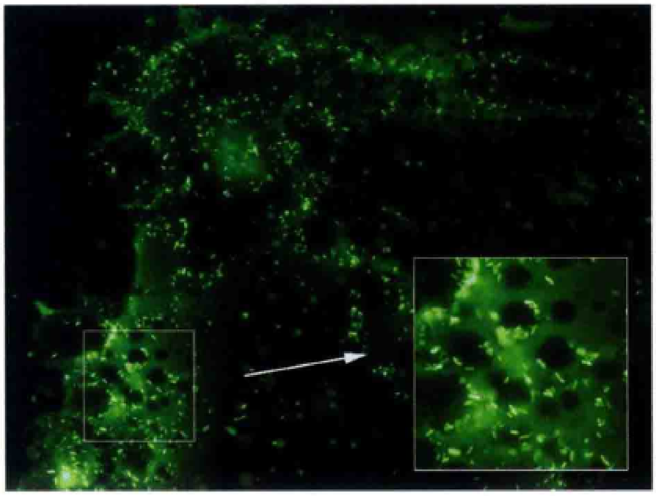


图 31-2

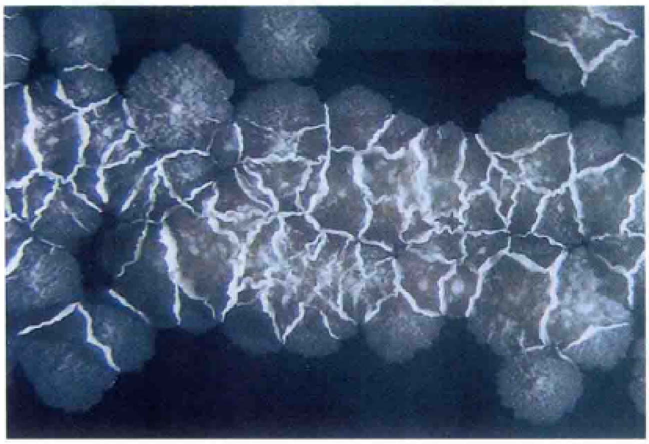


图 32-1

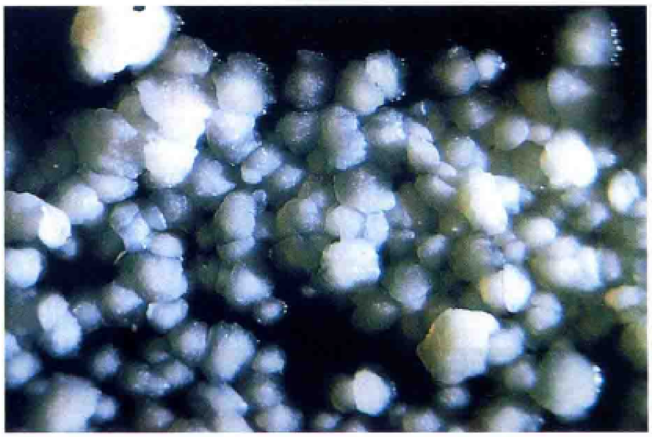


图 32-2

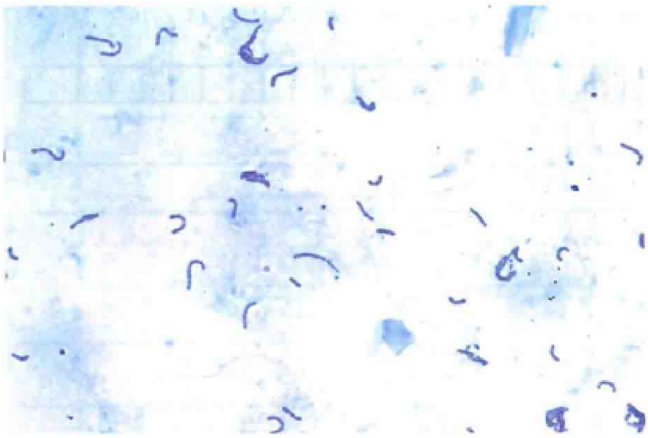


图 32-3



图 32-4



图 33-1



图 33-2



图 33-3

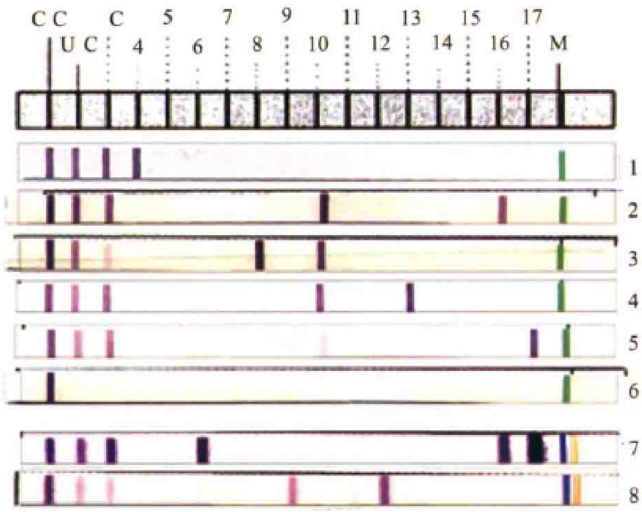


图 33-4

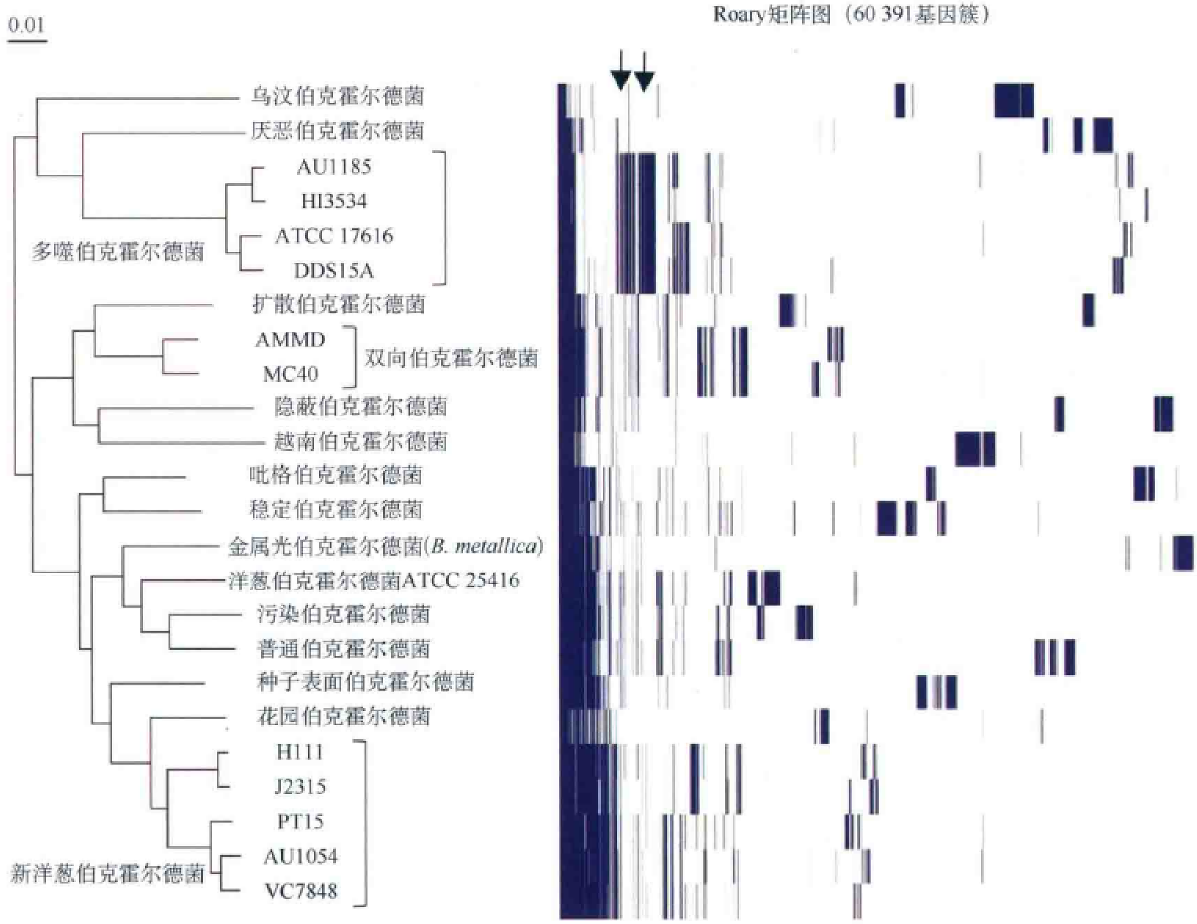


图 35-4

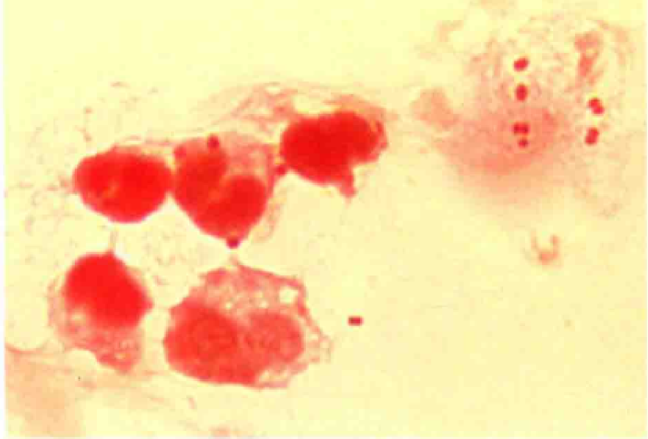


图 36-1

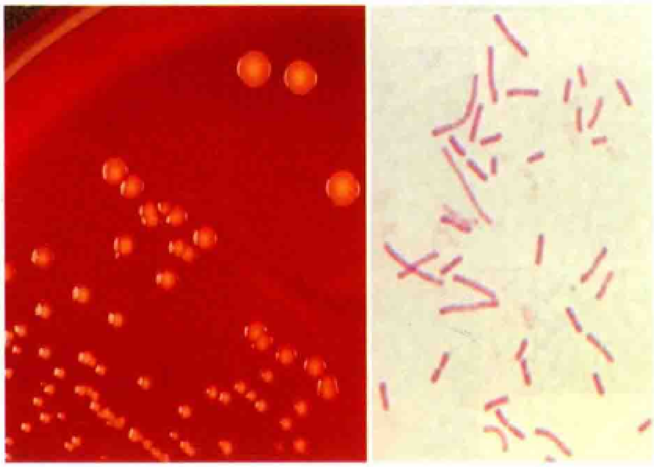


图 36-2

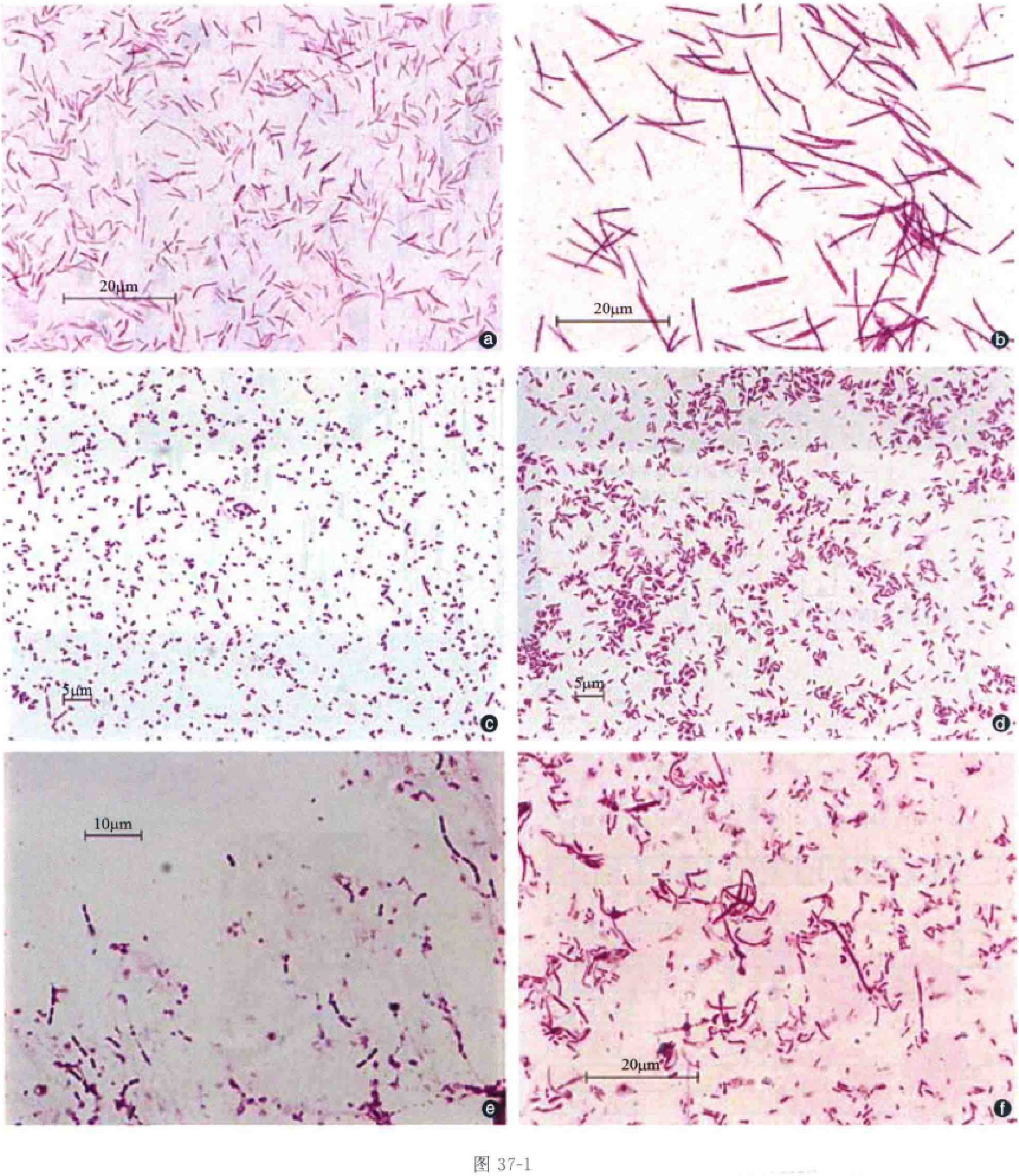


图 37-1

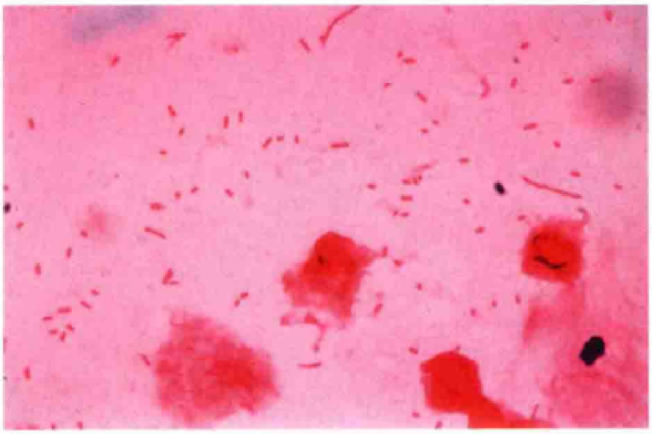


图 38-2

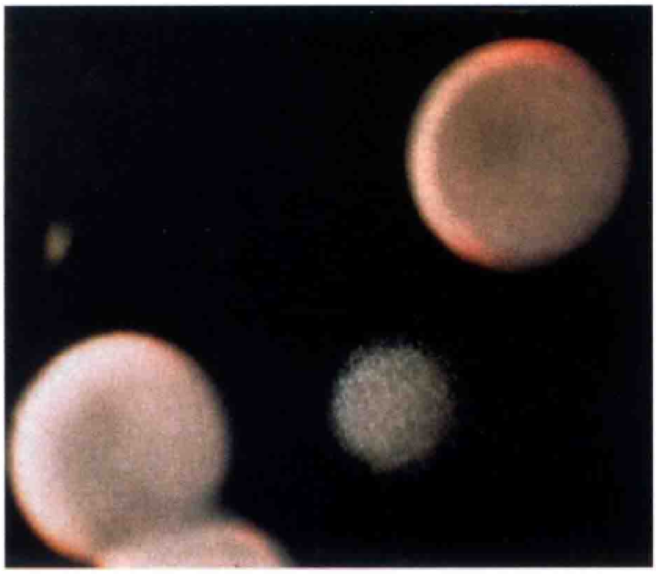


图 38-4



图 38-3

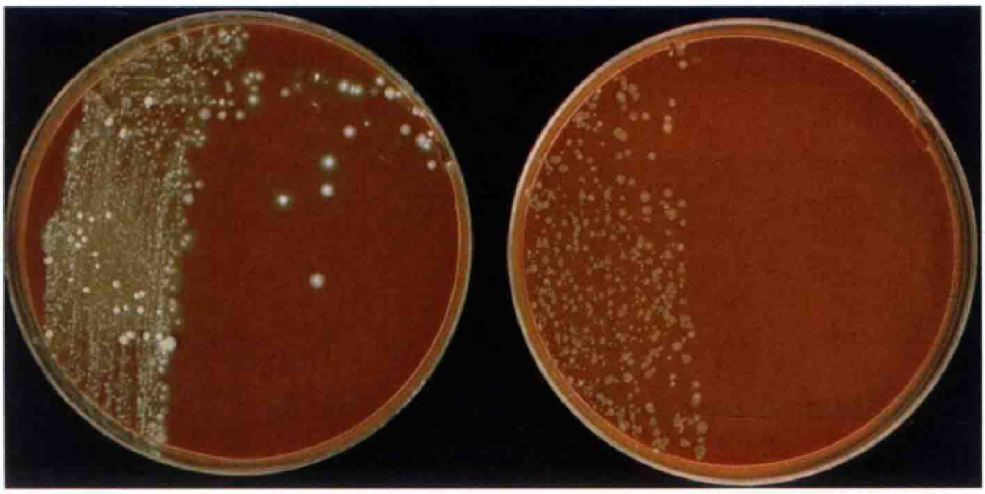


图 38-5

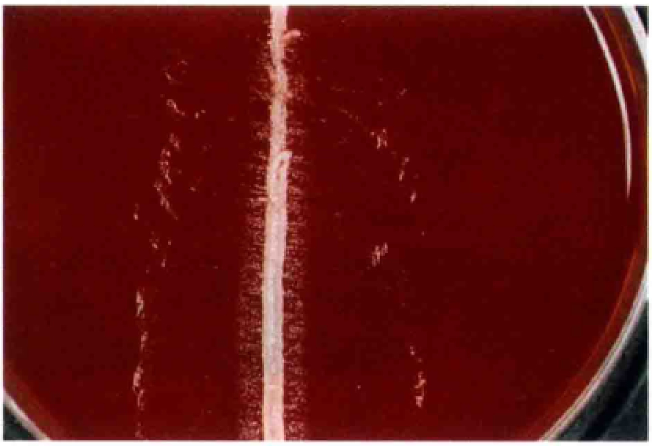


图 38-6

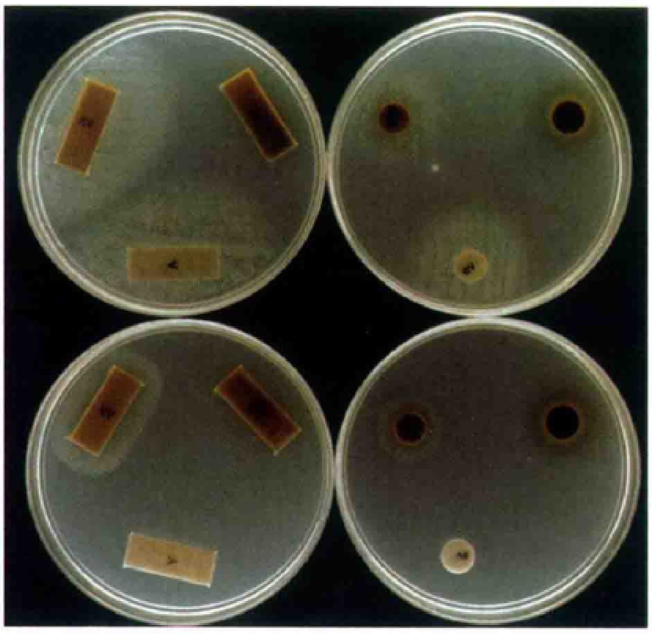


图 38-7



图 38-8

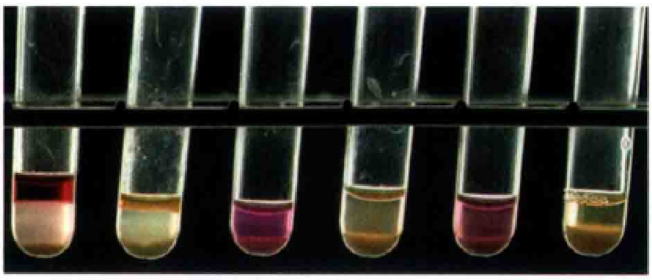


图 38-9



图 39-1



图 41-1

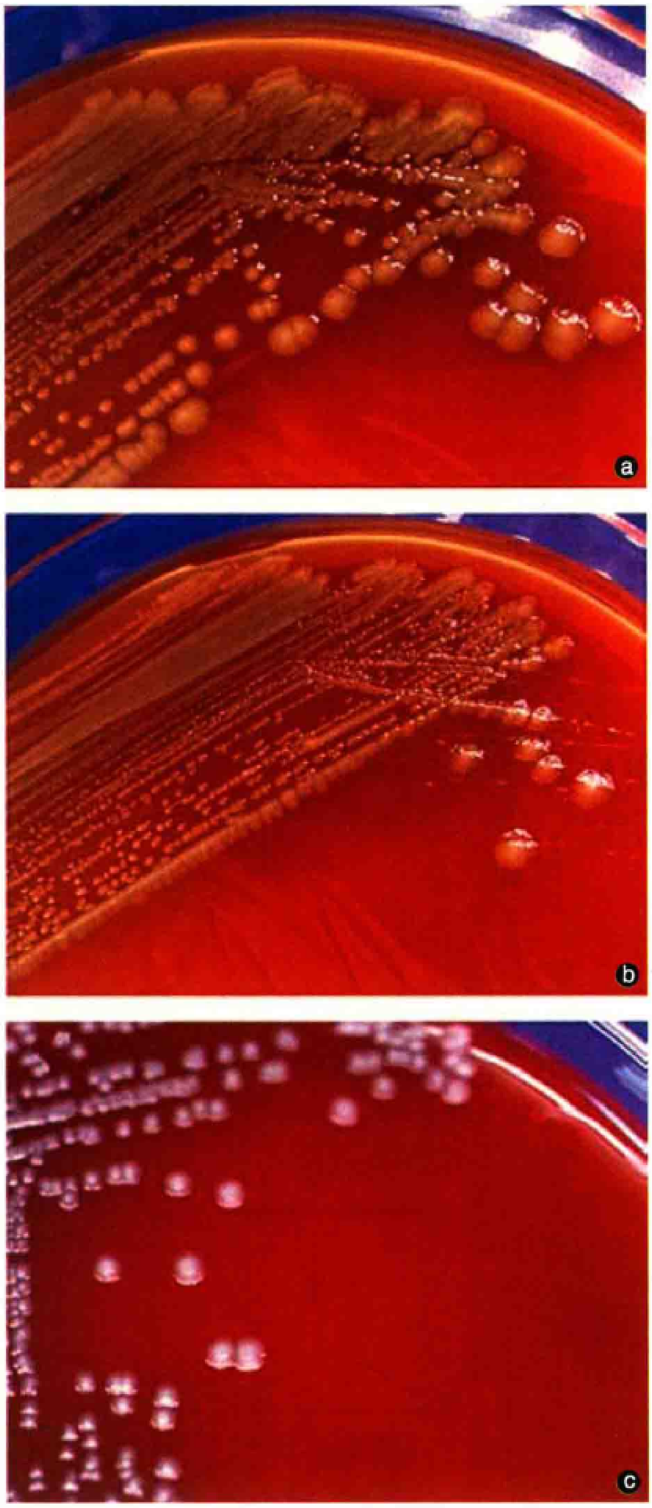


图 41-2



图 41-3

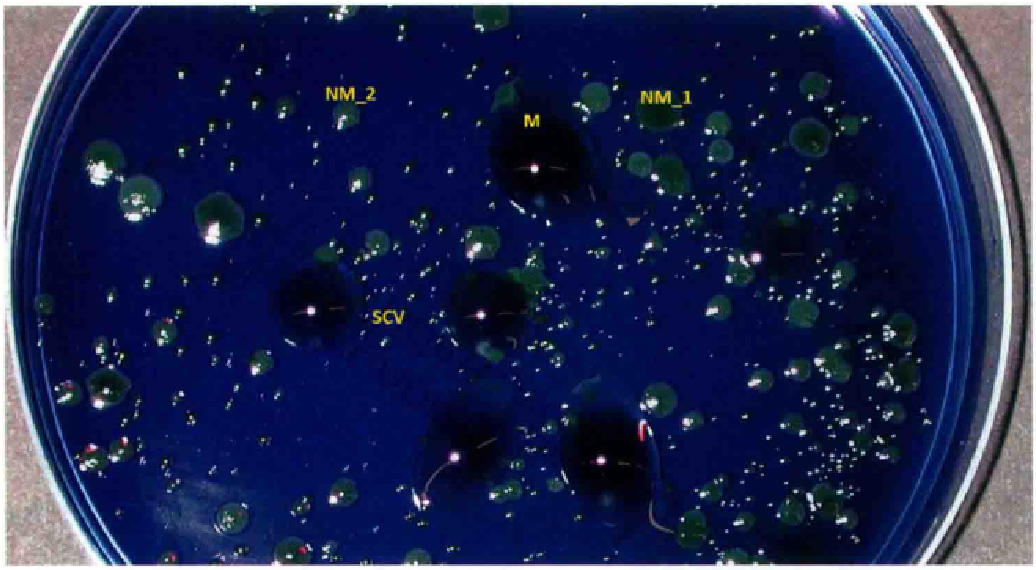


图 44-1

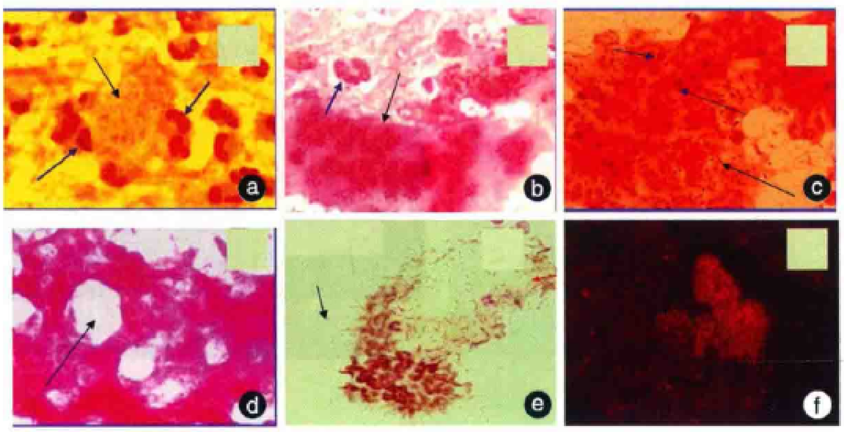


图 44-2

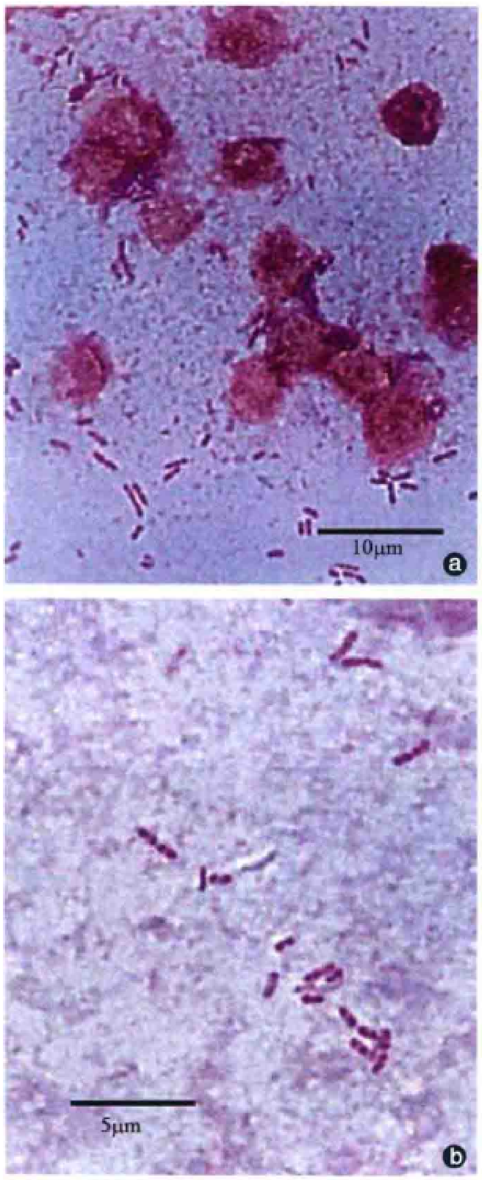


图 45-1

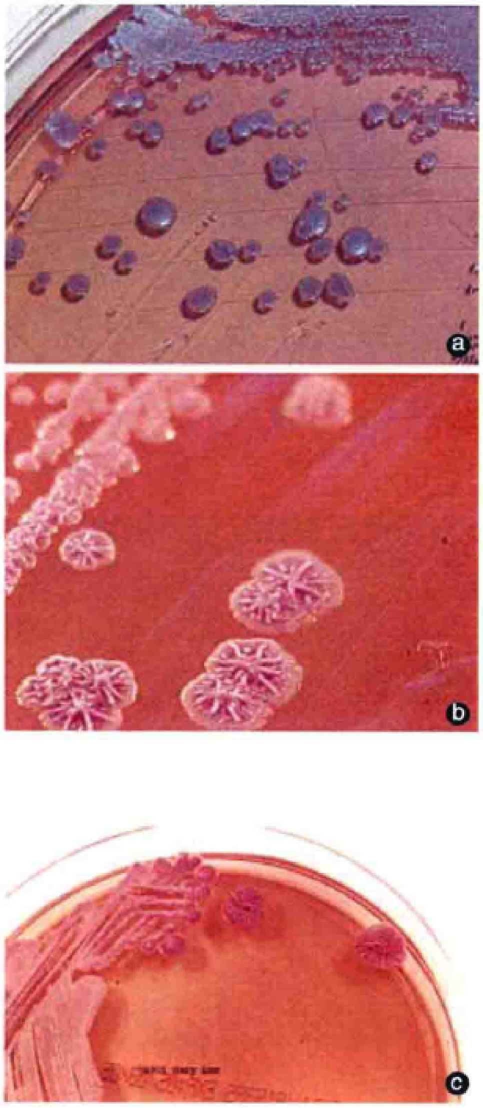


图 45-2

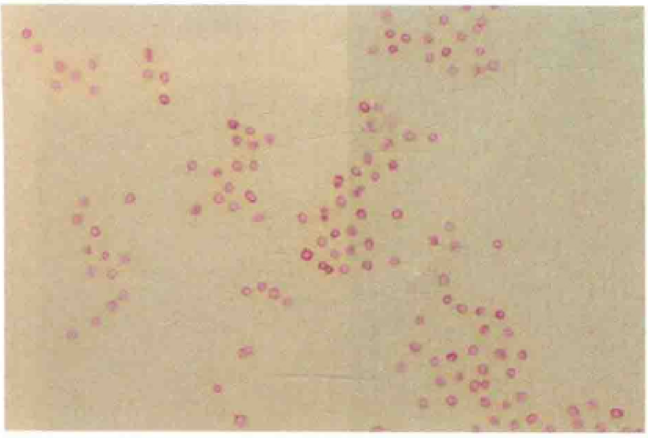


图 46-3

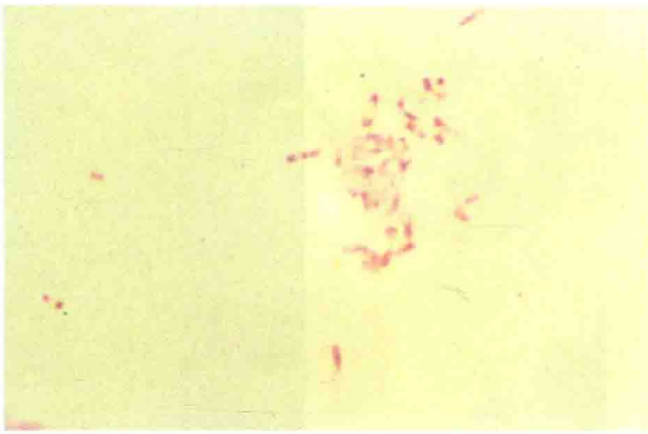


图 46-4

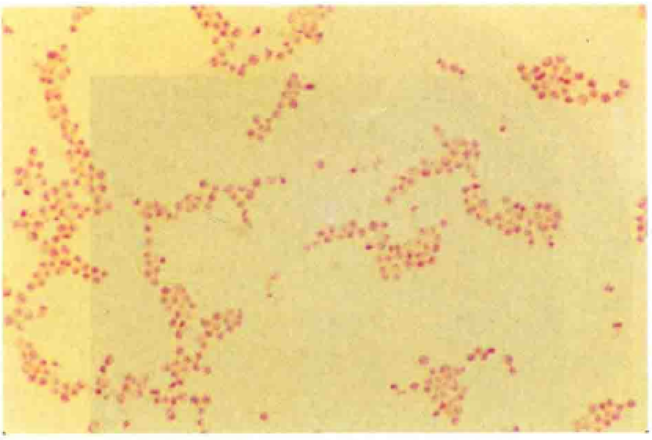


图 46-5

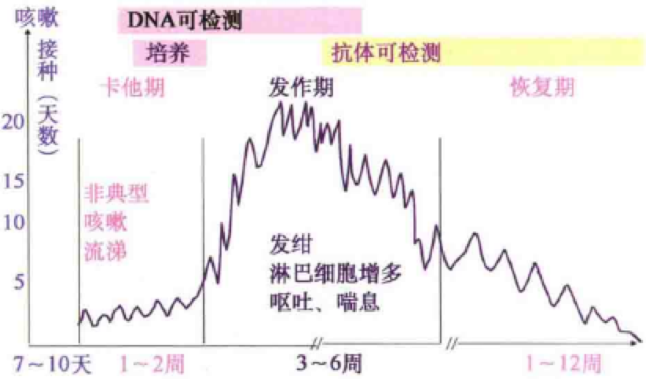


图 47-1

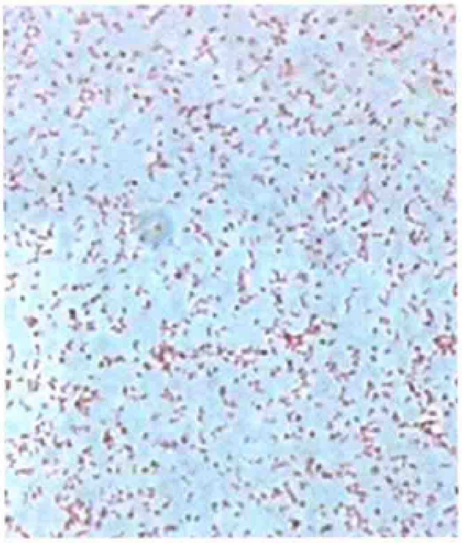


图 48-1

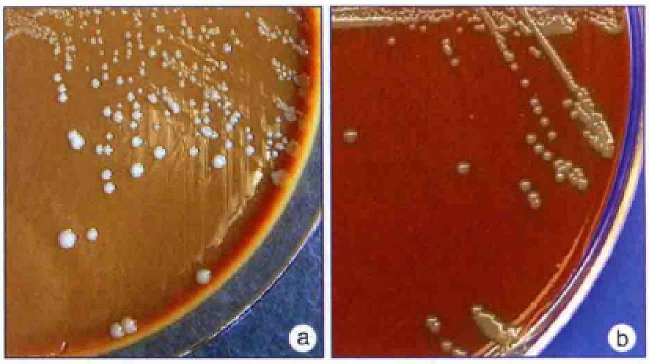


图 48-2

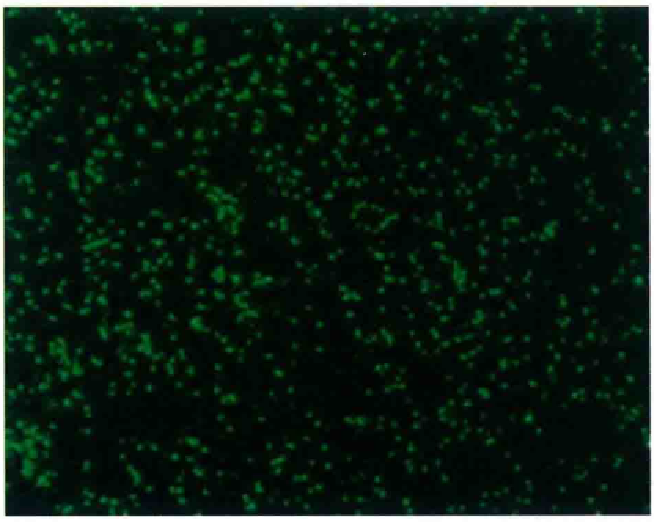


图 48-3

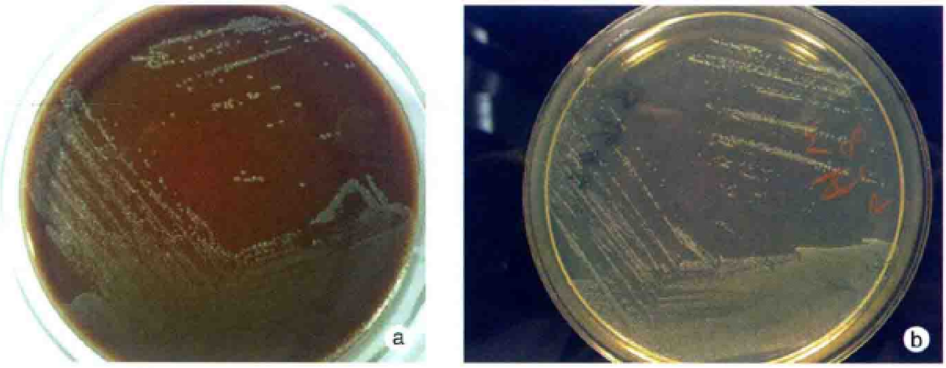


图 49-1

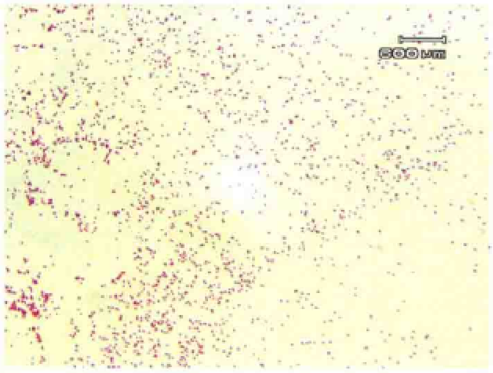


图 49-2



图 50-1

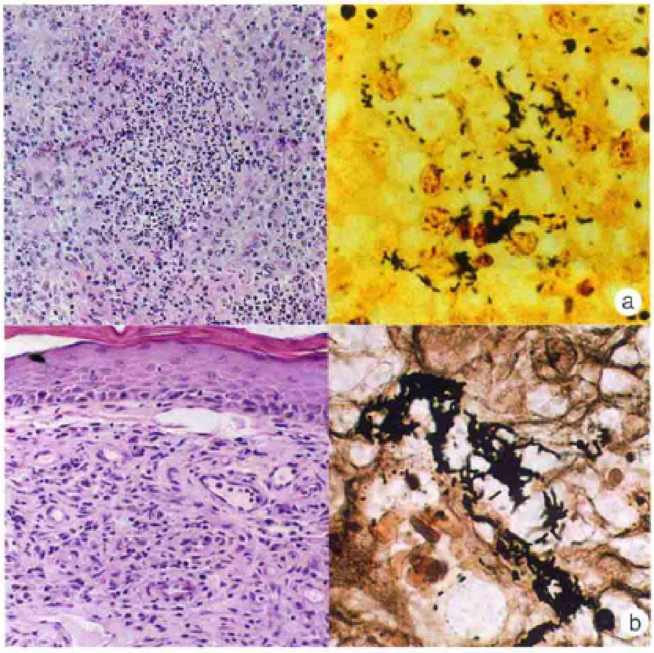


图 50-2

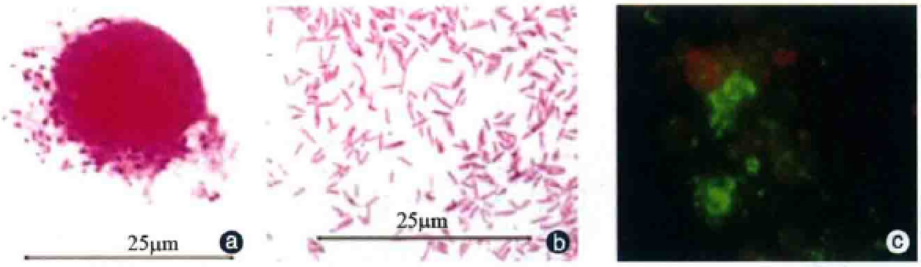


图 51-1

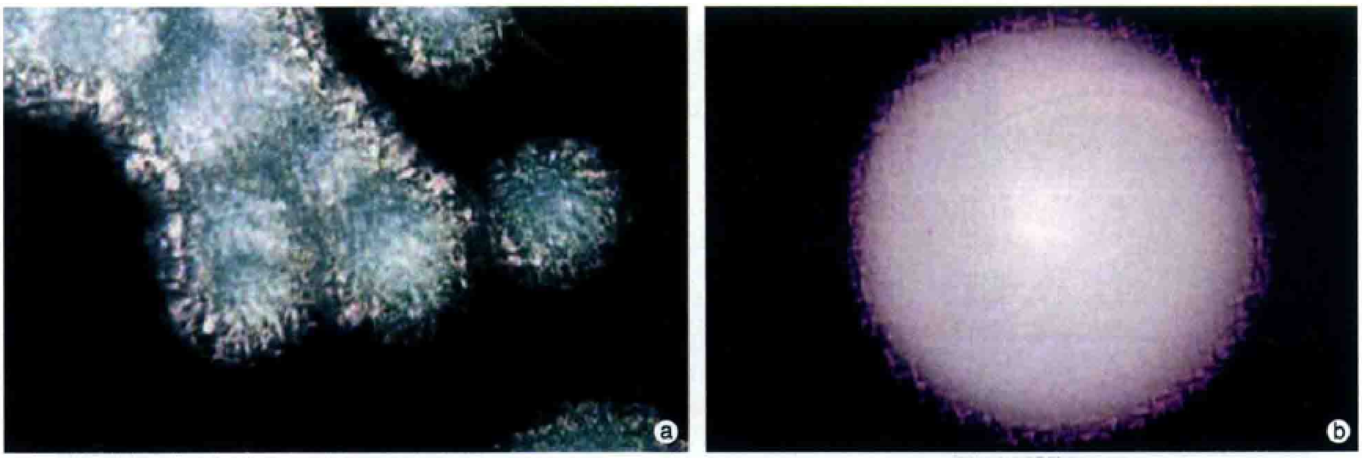


图 51-2

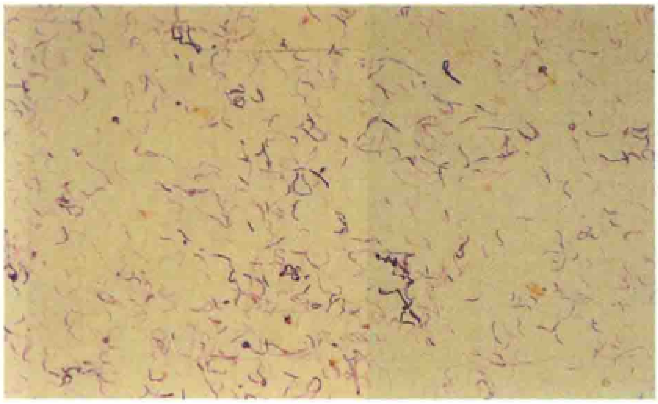


图 55-1



图 55-2

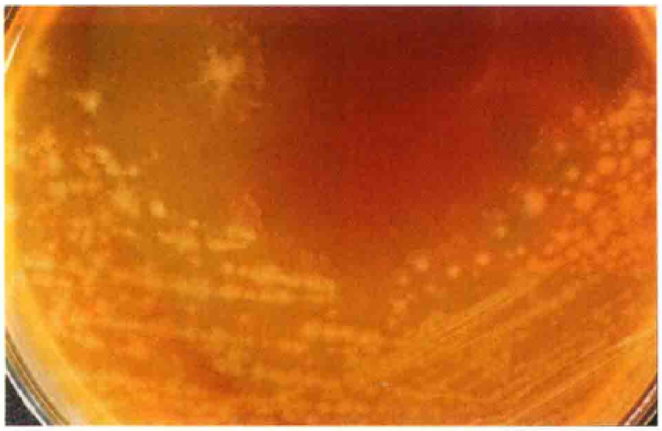


图 55-3



图 55-4



图 55-5

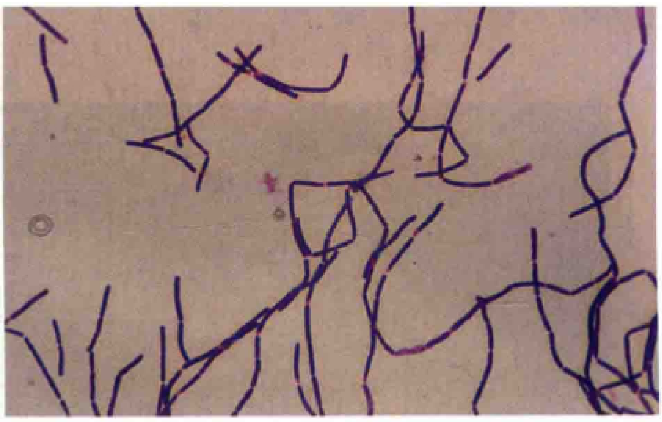


图 55-6



图 56-1

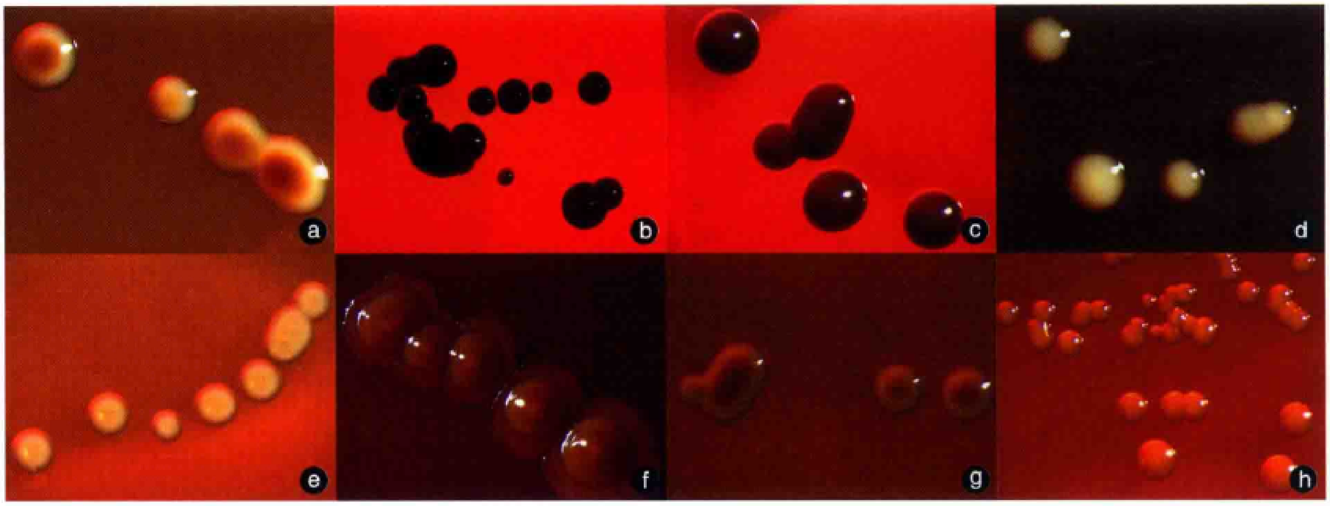


图 56-2

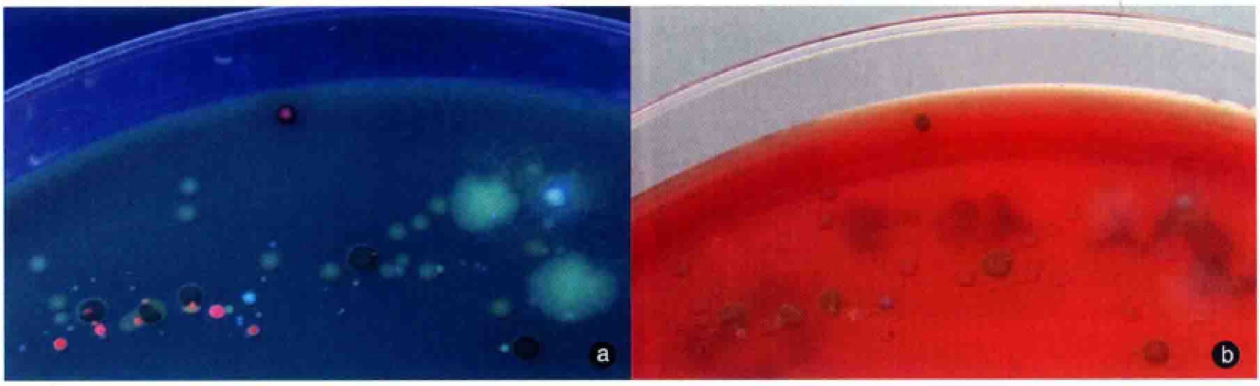


图 56-3

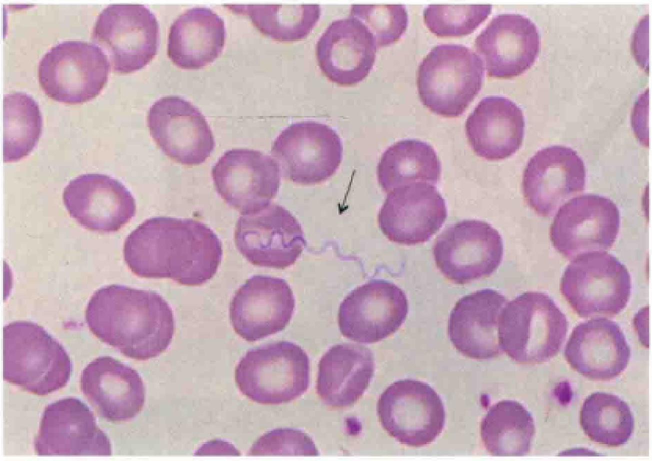
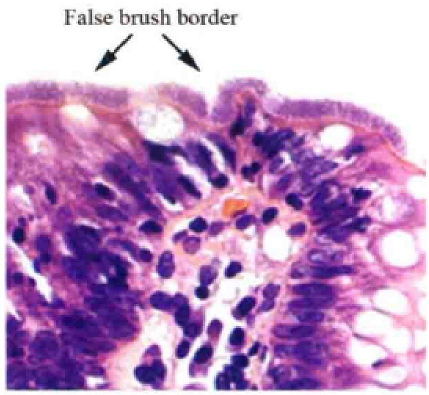


图 61-1



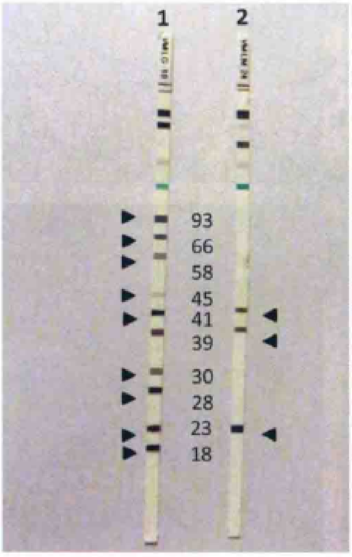


图 61-2

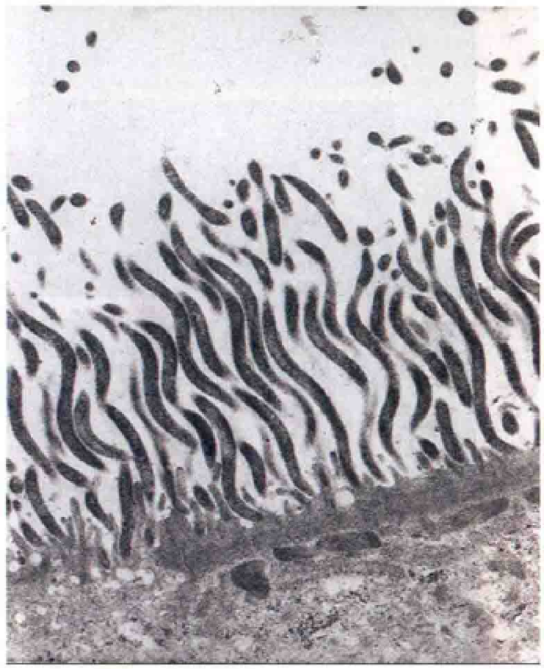


图 62-2

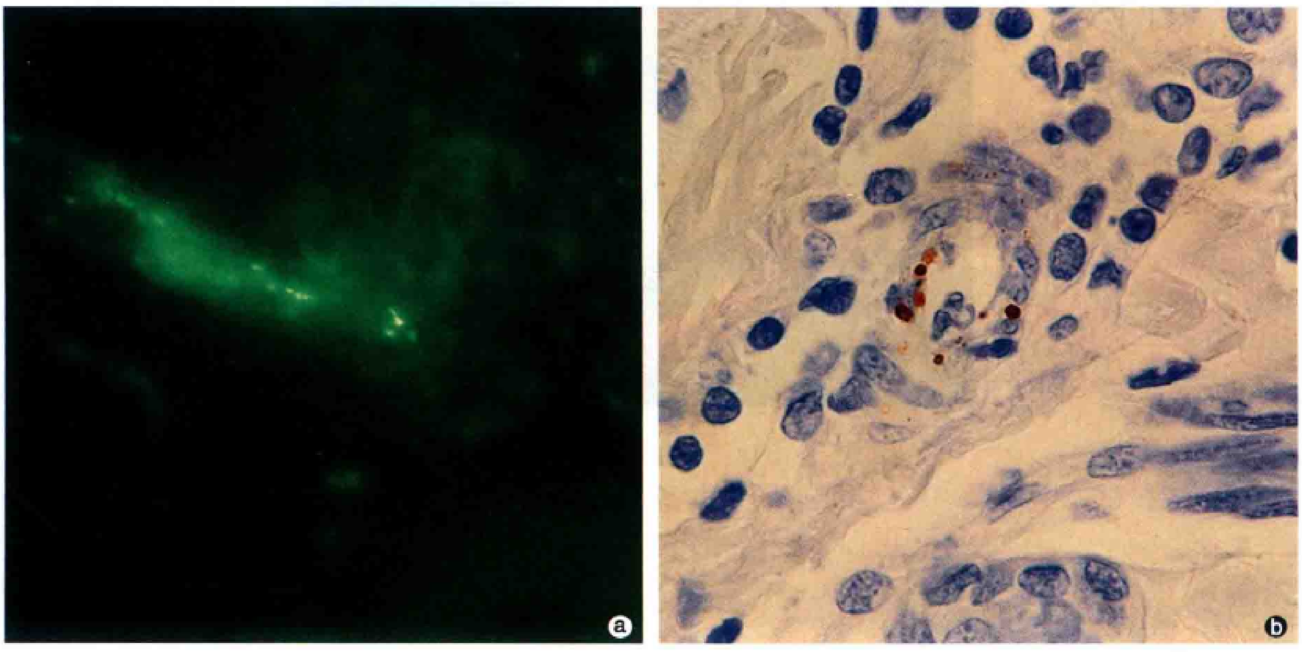


图 66-2

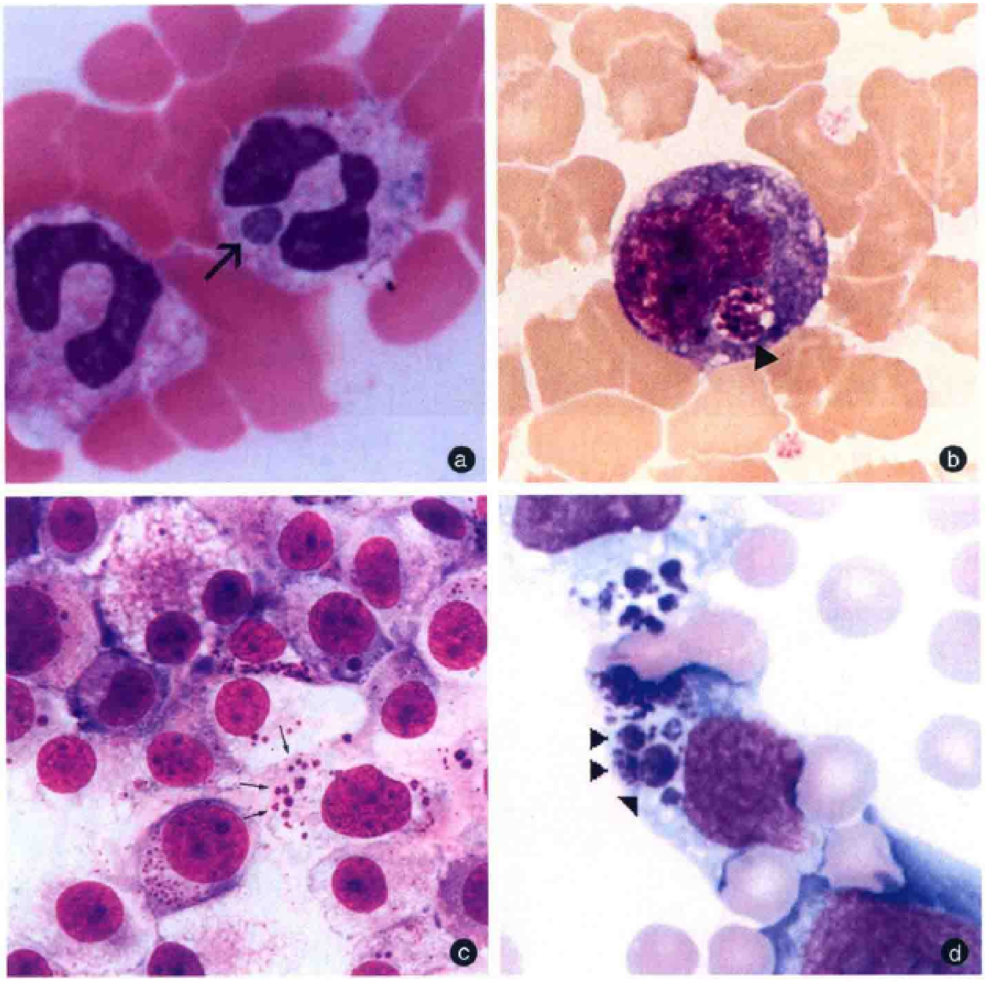


图 67-2



图 68-1

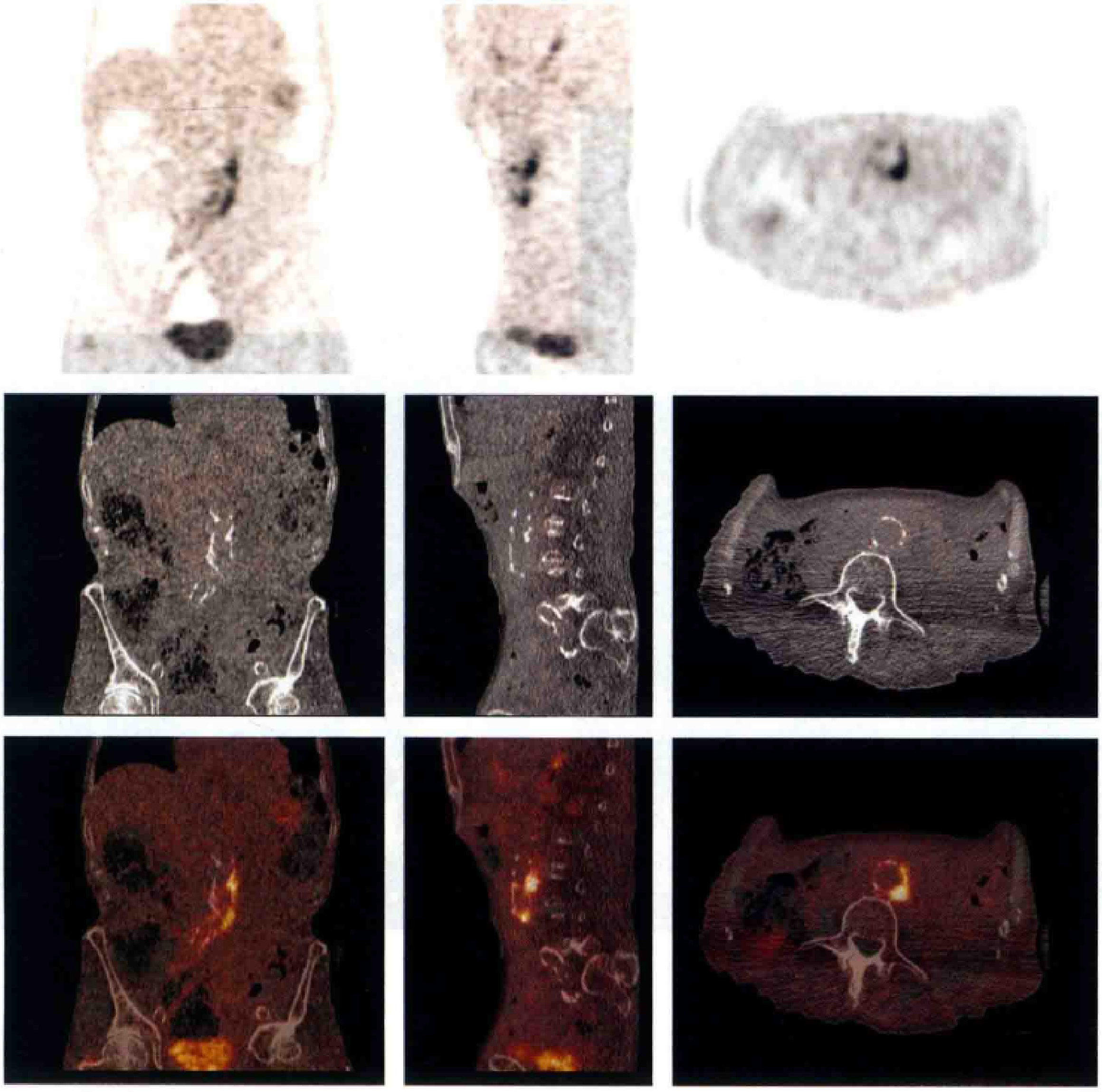


图 68-2

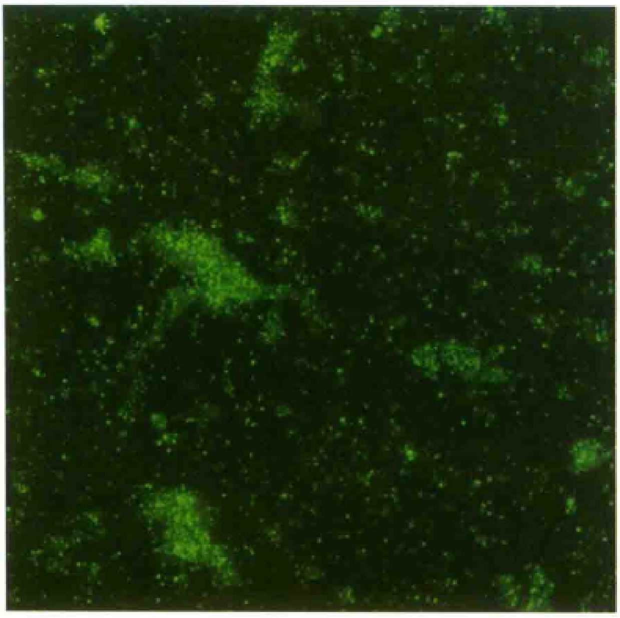


图 68-3

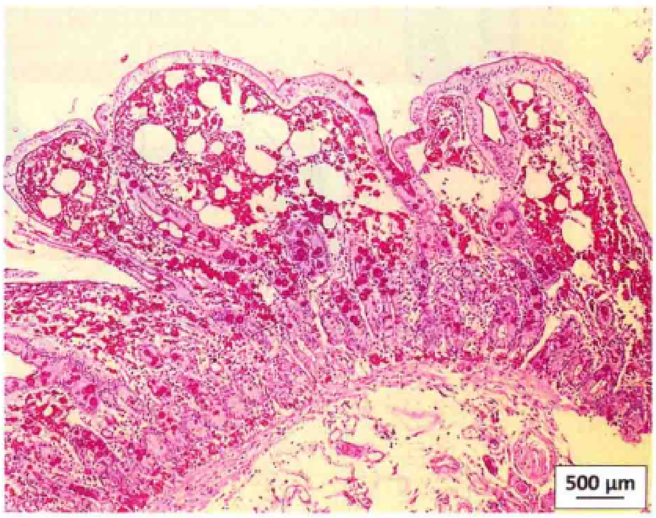


图 69-1

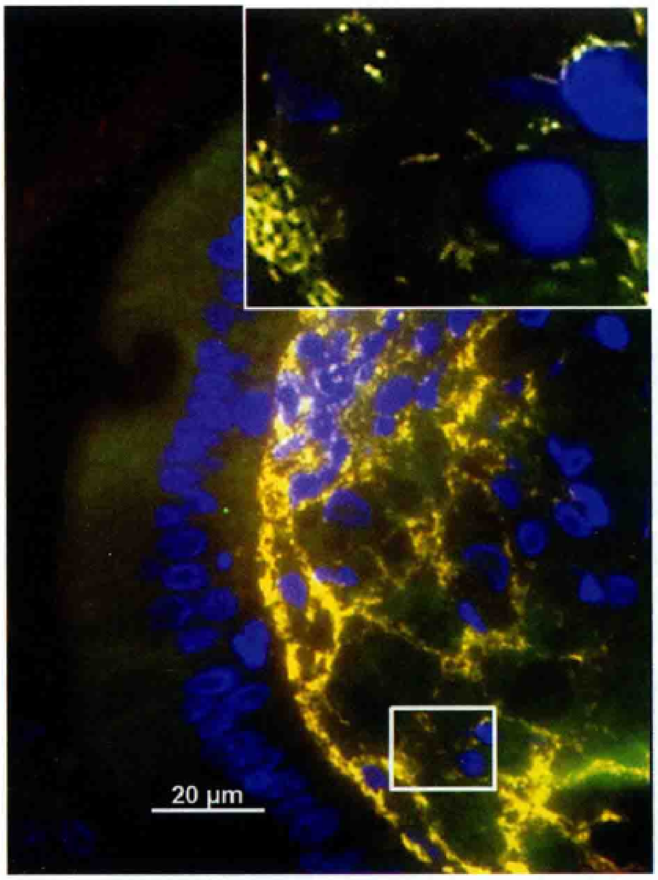


图 69-2

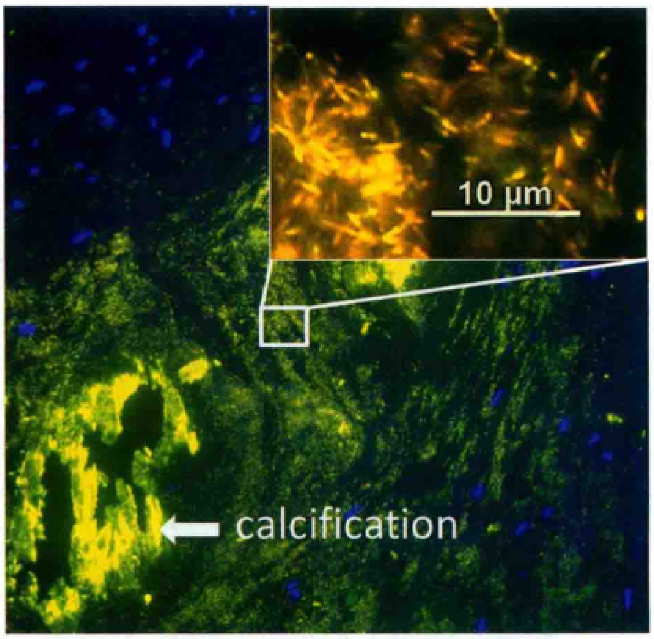


图 69-3

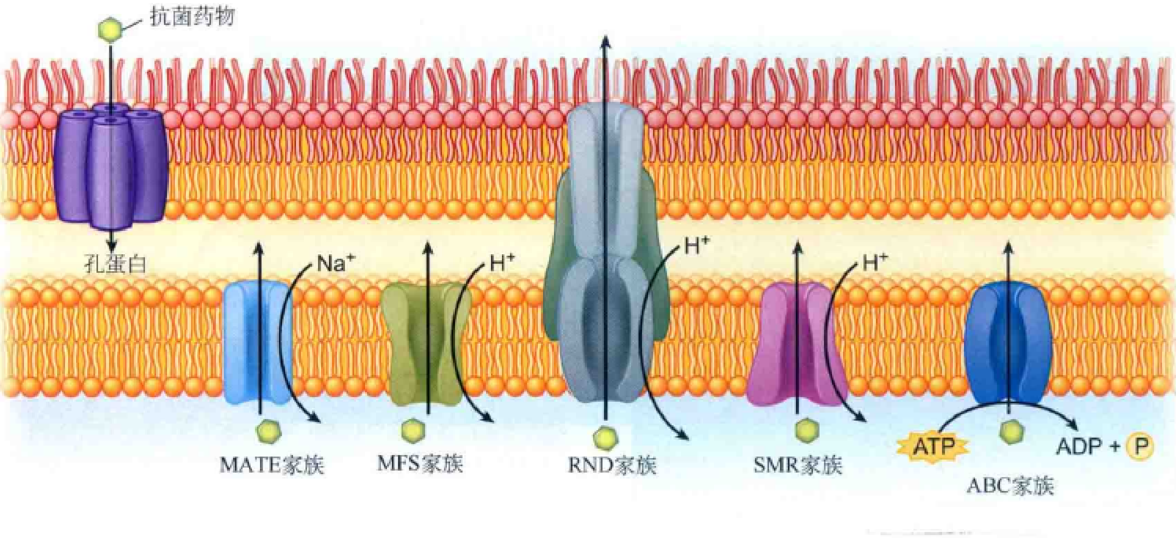


图 71-1